

ANNALES  
DE  
L'INSTITUT PASTEUR

**Sensibilisatrice spécifique dysentérique**

dans le sérum des animaux vaccinés et des malades.

PAR M. CH. DOPTER

Médecin-major de 2<sup>e</sup> classe, Professeur agrégé au Val-de-Grâce.

Les travaux de Bordet ont contribué à établir que, dans le sérum des animaux vaccinés contre un microbe donné, il existe une substance sensibilisatrice spécifique, utilisée par l'organisme pour lutter contre l'action de ce germe. Sous son influence, ce dernier devient capable de fixer l'alexine, qui assurera la bactériolyse.

Bordet et Gengou<sup>1</sup> démontrent l'existence de cette substance particulière dans le sérum de chevaux vaccinés contre le rouget du porc, dans le sérum de cobayes vaccinés contre le premier vaccin charbonneux, le *Proteus vulgaris*, le bacille typhique, le bacille pesteux, etc. Besredka en détermina la présence dans le sérum de chevaux immunisés contre le streptocoque. Il la reconnut encore dans le sérum de chevaux immunisés contre le bacille de Löffler, mais non contre sa toxine.

Enfin, le sérum des animaux *vaccinés* n'est pas le seul à véhiculer cette sensibilisatrice : Bordet et Gengou purent la déceler dans le sérum d'individus *infectés*, et notamment chez deux convalescents de fièvre typhoïde.

MM. Widal et Le Sourd<sup>2</sup>, reprenant ces faits pour les appliquer à la médecine humaine, furent conduits à admettre l'existence presque constante d'une sensibilisatrice spécifique dans le sérum des typhiques.

1. BORDET et GENGOU, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1901.

2. VIDAL et LE SOURD, *Soc. méd. des Hôpitaux*, 14 juin 1901.

Poursuivant depuis plusieurs années des recherches sur la dysenterie, j'ai cru intéressant de tenter les mêmes investigations sur le sérum d'animaux vaccinés contre le bacille dysentérique, et celui des malades atteints de dysenterie, soit bacillaire, soit amibienne !. L'intérêt de cette question ne concernait pas seulement l'histoire du pouvoir sensibilisateur des sérums en général, et du sérum dysentérique en particulier; de la constatation de cette sensibilisatrice, pouvaient découler des données importantes sur la spécificité respective des divers bacilles dysentériques connus.

Tout d'abord, cette substance existe-t-elle? Si elle existe, comment se comporte-t-elle vis-à-vis des divers échantillons de bacille dysentérique, isolés jusqu'alors? Telle est l'idée qui a orienté ce travail.

1. Pour arriver à déceler cette sensibilisatrice, j'ai utilisé la réaction de fixation de Bordet avec la technique que c'est auteur a indiquée. Pour chaque expérience, 5 tubes à essai m'ont semblé nécessaires; ils ont été utilisés de la façon suivante : 1<sup>e</sup> Dans 3 tubes, étaient versées 20 gouttes du sérum dont la sensibilisatrice était cherchée. Ce sérum avait été chauffé préalablement à 56° pendant 1/2 heure. Dans les 2 autres tubes, on versait 20 gouttes d'égal volume d'un sérum témoin, soumis au même chauffage. 2<sup>e</sup> A ces 5 tubes, était ajoutée une émulsion de bacilles dysentériques provenant d'une culture raclée sur gélose, âgée de 24 heures. Le nombre de gouttes doit être cherché par tâtonnements, il varie avec l'abondance de l'émulsion. Cette émulsion demande à être bien homogène, pour que, d'une expérience à l'autre, les résultats soient comparables; la quantité doit être rigoureusement la même sous peine de s'exposer à des mécomptes et des erreurs d'interprétation. 3<sup>e</sup> A ce mélange, était ajouté du sérum alexique de cobaye, saigné la veille, dans les proportions suivantes : le 1<sup>er</sup> tube recevait 3 gouttes, le 2<sup>e</sup> 4 gouttes, le 3<sup>e</sup> 5 gouttes. Pour les tubes témoins, le 1<sup>er</sup> recevait 3 gouttes, le 2<sup>e</sup> 5 gouttes.

Ce mélange de sérum, dont la propriété sensibilisatrice était recherchée, de microbes et d'alexine, était abandonné à lui-même pendant 5 heures environ.

Au bout de 5 heures, un nouveau mélange était constitué :

Une partie de globules rouges de lapin, — lavés, après défibrination préalable, à trois reprises différentes à l'aide d'une solution salée à 7/1000, pour les débarrasser de toute trace d'alexine, — était mélangé avec 2 parties de sérum hémolytique : ce dernier provenant de cobayes préparés antérieurement par des injections répétées de sang défibriné de lapins, était chauffé à 56° pendant 1/2 heure.

De ce deuxième mélange, 3 à 4 gouttes étaient versées dans chacun des 5 tubes d'expérience; ceux-ci, agités quelques moments, étaient ensuite abandonnés à eux-mêmes et montraient bientôt si la réaction de fixation était positive ou négative : positive, les globules rouges ne tardaient pas à s'agglutiner au fond du tube, et le liquide qui surnageait ne présentait pas d'hémolyse; négative, au contraire, on assistait à la dissolution progressive des hématies et toute la masse liquide était hémolisée.

Pour cette technique, j'ai eu recours à l'extrême complaisance de M. Besredka. Qu'il veuille bien recevoir ici l'expression de mes sincères et bien vifs remerciements.

## I

## RECHERCHES SUR LE SÉRUM DES ANIMAUX VACCINÉS

J'ai employé pour ces recherches, d'une part, le sérum d'un cheval traité depuis 18 mois par les injections multiples, sous-cutanées et intraveineuses, de bacille dysentérique de Shiga; d'autre part, le sérum de lapins immunisés contre le bacille de Flexner (Manille). (On sait que ces germes représentent deux types, se différenciant l'un de l'autre par les propriétés agglutinatives et leur action sur les sucres.)

Comme témoins, non seulement du sérum de cheval neuf, mais du sérum antityphique d'une part, du bacille typhique de l'autre, ont été soumis aux mêmes épreuves.

Dans une première série d'expériences, le sérum du cheval (Shiga-sérum) a été expérimenté vis-à-vis du bacille ayant servi à l'immunisation et des divers bacilles que l'on rapporte au même type (bacilles de Shiga, Pfühl, Vaillard et Dopter, Auché, etc.; de même, le sérum de lapin (Flexner-sérum) sur l'échantillon de Flexner (Manille) et les bacilles que l'on classe actuellement dans le même groupe, ou même que certains auteurs veulent encore différencier les uns des autres : bacilles de Jürgens, Braun, Roussel et Job, etc... Les résultats ont été les suivants :

TABLEAU I.

	Kruse.	Shiga.	Pfuhl.	Vaillard et Dopter 1902.	Dopter 1904.	Auché 1904.	Éberth.
Shiga-sérum ..	+	+	+	+	+	+	-
Éberth-sérum ..	-	-	-	-	-	-	+
Sérum normal ..	-	-	-	-	-	-	-

TABLEAU II.

	Flexner (Manille).	Jürgens.	Strong.	Dopter 1904.	Braun.	Éberth.
Flexner-sérum.	+	+	+	+	+	-
Éberth-sérum.	-	-	-	-	-	+
Sérum normal.	-	-	-	-	-	-

La lecture des résultats consignés sur ces tableaux montre donc que *dans le sérum d'un animal vacciné contre un bacille dysentérique donné, il existe une substance sensibilisatrice spécifique, non seulement pour ce germe, mais pour tous ceux qui, bien que provenant d'origines variées, rentrent dans le même type.*

Restait à savoir comment se comportait cette sensibilisatrice, contenue dans un sérum, vis-à-vis des germes de type autre que celui du bacille ayant servi à l'immunisation : chacun des sérums a donc été expérimenté indifféremment avec la plupart des bacilles dysentériques connus ; dans cette deuxième série, le pseudo-dysentérique de Kruse (dys. des aliénés) fut ajouté.

TABLEAU III.

	Shiga.	Kruse.	Pföh.	V. et Dopter.	Dopter 1904.	Auché 1904.	Flexner (Manille).	Jürgens.	Strong.	Dopter 1904.	Braun, Roussel et Job.	Pseudo-dys. Kruse.
Shiga-sérum ....	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Flexner-sérum ..	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-
Sérum normal ..	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

En faisant donc agir soit le Shiga-sérum, soit le Flexner-sérum sur tous ces échantillons variés de bacilles dysentériques, qu'ils se rapportent ou non au type qui a servi à l'immunisation, les résultats sont toujours identiques : alors que les témoins sont nettement hémolysés et que la dissolution des globules rouges est totale, dans les sérums en expé-

rience, l'hémolyse est nulle et les hématies agglutinées au fond du tube restent intactes : la réaction de fixation de Bordet est *toujours* et *également* positive dans tous les cas.

Ce fait entraîne donc la conclusion suivante :

*Dans le sérum d'un animal vacciné contre l'un des types connus des bacilles dysentériques, la sensibilisatrice existe aussi bien pour celui qui a servi à la vaccination que pour ceux qui y sont étrangers, à quelque type qu'ils appartiennent.*

Cette donnée mérite d'être retenue : on verra plus loin quelles importantes déductions elle est de nature à entraîner.

## II

### RECHERCHES SUR LE SÉRUM DES MALADES

Le sérum de malades atteints de dysenterie, soit bacillaire, soit amibienne, a été expérimenté au même titre : des cas bénins, moyens et graves, ont été utilisés dans ce but ; le prélèvement du sang a été effectué à des phases variées de l'évolution de la maladie. Pour chacun, l'étiologie microbienne avait été déterminée par l'isolement du bacille des matières fécales et l'agglutination.

La technique a été rigoureusement identique à celle qui fut utilisée pour les sérum d'animaux vaccinés. Des séums de pneumoniques, phthisiques, typhiques, etc..., soumis aux mêmes épreuves, ont servi de témoins. De plus, dans chaque expérience, le sérum de dysentérique a été mis en contact avec du bacille typhique et plusieurs échantillons de colibacilles.

Voici quels furent les résultats :

## TABLEAU IV.

TABLEAU IV (Suite).

759

OBSERVATION résumée du malade.	AGGLUTINATION		RÉACTION DE FIXATION							
	Shiga.	Flexner.	Shiga.	Flexner.	Eberth	Coli I.	Coli II.	Coli III.	Coli IV.	Coli V.
MARV... — Dys. bénigne. 6 <sup>e</sup> jour .....	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+
10 <sup>e</sup> jour (déclin) .....	+	—	+	+	—	—	—	—	+	+
12 <sup>e</sup> jour (guérison)... (Type Shiga-Kruse.)	+	—	—	—	—	—	—	—	+	+
Témoin : Sérum de cardiaque....	—	—	—	—	—	—	+	—	+	—
ROB... — Dys. grave. 13 <sup>e</sup> jour. (Selles sanglantes)..... (Type Shiga-Kruse.)	+	+	+++	+++	—	—	—	—	+	+
1/200 1/50										
Témoin : Sérum d'érysipèle . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+
ALBERT... — Dys. moy. 14 <sup>e</sup> jour (déclin)..... (Type Shiga-Kruse.)	+	—	++	++	—	+	—	—	—	—
1/30										
Témoin : Sérum de fièvre typhoïde.	—	—	—	—	+++	—	+	—	—	—
VEND... — Dys. moy. 30 <sup>e</sup> jr (convalescence depuis 8 jours)..... (Type Shiga-Kruse.)	+	—	+	+	—	—	—	—	—	—
1/50										
Témoin : S. de broncho-pneumonie.	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+
NIOG... — Dys. moy. 6 <sup>e</sup> jour .....	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
11 <sup>e</sup> jour .....	+1/80	—	++	++	—	—	—	—	—	—
16 <sup>e</sup> jour (état normal). (Type Shiga-Kruse.)	+1/80	—	+	+	—	—	—	—	—	—
Témoin : Sérum de rhumatisant...	—	—	—	—	—	+	—	—	+	—
CHAUF... — Dys. grave récidivée. 29 <sup>e</sup> jour (en pleine période d'état). (Type Shiga-Kruse.)	—	—	++	+++	—	—	—	+	+	—
Témoin : Sérum de typhique: . . .	—	—	—	—	++	—	—	+	+	—
COTT... — Dys. amibiennne de moyenne intensité. 19 <sup>e</sup> jour (d'une réchute) .....	—	—	—	—	—	—	+	—	+	+
Témoin : Sérum d'érysipèle.....	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+
FOURN... — Dys. amibiennne de moyenne intensité. 19 <sup>e</sup> jour (d'une réchute) .....	—	—	—	—	—	+	—	—	+	+
Témoin : Sérum de typhoïdique....	—	—	—	—	++	—	—	+	+	+
JOUGL... — Dysenterie amibiennne prolongée, datant de 8 mois (rechutes successives).	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—
Témoin : Sérum de typhoïdique... .	—	—	—	—	++	—	—	+	+	+
CH AUM... — Dys. amibiennne grave. 41 <sup>e</sup> jour (période d'état) .....	—	—	—	—	—	—	—	+	+	—
Témoin : Sérum de rougeole....	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+

Le signe : +++ correspond à une réaction très nette.

++ — nette.  
+ — légère.

De ces constatations se dégagent quelques données intéressantes :

1<sup>o</sup> *Existence d'une substance sensibilisatrice dans le sérum des malades.* — La réaction de fixation de Bordet s'est montrée le plus souvent positive, mais à des degrés divers, quand le sérum de malade était éprouvé vis-à-vis du bacille dysentérique : l'hémolyse était nulle ou partielle.

Les résultats furent négatifs au contraire dans toutes les expériences « témoins » ; l'hémolyse y était nette, franche et rapide.

La conclusion s'impose donc : *il existe, dans la plupart des sérum de malades atteints de dysenterie bacillaire, une substance sensibilisatrice, impressionnant le bacille spécifique et lui conférant la propriété de fixer l'alexine.*

2<sup>o</sup> *Spécificité de cette sensibilisatrice.* — Cette sensibilisatrice est-elle spécifique ? Positives avec le bacille dysentérique, négatives avec le bacille d'Eberth qui se rapproche infiniment de ce dernier, les diverses réactions semblent le prouver ; mais les mêmes expériences faites avec le colibacille paraissent de nature à ébranler quelque peu la conviction à cet égard.

La lecture du tableau précédent montre en effet que, dans ces derniers cas, l'hémolyse ne s'est pas toujours produite.

Pareils faits ont déjà été signalés par MM. Bordet et Gengou, puis MM. Widal et Le Sourd, dans leurs recherches sur le sérum des typhoïdiques. Or, ces derniers n'en avaient pas moins conclu à la spécificité de la sensibilisatrice typhique, car la réaction avec le bacille d'Eberth était incomparablement plus nette qu'avec le *Bact. coli*.

Les expériences résumées dans le tableau IV montrent d'autre part plusieurs points importants :

1) La réaction de fixation, nettement positive avec les bacilles dysentériques, peut exister aussi, bien qu'à un degré plus minime, avec le colibacille. Mais en expérimentant, comme je l'ai fait, avec plusieurs échantillons de ce germe, on s'aperçoit que certains fixent l'alexine, alors que d'autres ne présentent pas ce pouvoir ;

2) C'est le plus souvent avec les mêmes échantillons que la réaction de fixation devient positive ;

3) Fait capital, les sérum témoins, qui n'ont jamais pré-

senté de sensibilisatrice vis-à-vis du bacille dysentérique, peuvent en présenter vis-à-vis de certains échantillons de colibacille. Enfin, certains sérum dysentériques donnent vis-à-vis du colibacille une réaction négative, alors qu'elle peut être positive avec des sérum témoins.

A elle seule, cette dernière constatation est de nature à ruiner l'objection que l'on pourrait opposer au caractère de spécificité de la sensibilisatrice dysentérique; on ne peut donc lui dénier cette propriété.

Dans les cas où la réaction de fixation est positive avec certains échantillons de colibacille, quelle interprétation en peut-on déduire?

On peut penser que tout sérum, quel qu'il soit, possède une sensibilisatrice vis-à-vis de certaines variétés de colibacille; l'hypothèse est d'autant plus vraisemblable que ces germes sont des hôtes habituels du tube digestif.

Mais, d'autre part, il est permis de supposer que le colibacille possède la propriété de fixer de l'alexine sans le secours de la sensibilisatrice, et à cet égard, certains échantillons la présenteraient plus que d'autres.

Quelle que soit d'ailleurs la solution de ce côté particulier du problème, les arguments précédents permettent de ne pas refuser le caractère de spécificité à la sensibilisatrice contenue dans le sérum des sujets atteints de dysenterie bacillaire.

*3<sup>e</sup> Propriétés de la sensibilisatrice spécifique de la dysenterie.* — La recherche de cette substance a été tentée avec le même sérum sur les deux types de bacille dysentérique : les types Shiga-Kruse et Flexner (Manille). Pour chaque malade, le bacille isolé de l'intestin avait été préalablement défini, classé et rapporté à l'un des deux groupes précédents. Le tableau IV montre à l'évidence qu'un sérum de malade infecté par le Shiga, par exemple, sensibilise aussi bien ce germe que le Flexner (Manille). Inversement, tous deux sont impressionnés de la même manière, avec une intensité rigoureusement égale, par le sérum d'un sujet porteur d'un bacille du groupe Flexner (Manille).

En est-il de même pour tous les échantillons rentrant dans ce type? Les expériences résumées dans le tableau V le prouvent surabondamment.

TABLEAU V.

SÉRUMS EMPLOYÉS	Agglutination		RÉACTION DE FIXATION											
	Shiga.	Flexner (Manille).	Shiga.	Kruse.	Pfehl.	Vaillard et Boullet Vincennes 1902.	Auché Bordeaux 1904.	Doppler Paris 1904.	Flexner (Manille).	Jürgens.	Strong.	Braun, Roussel et Job	Pseudo-dysentérique Kruse.	
ROBIN... — Dys. grave. 14 <sup>e</sup> jour. Selles sanglantes nombreuses .... ( <i>T. Shiga-Kruse</i> ).  <i>Témoin</i> : Sérum de pneumonique.	+	— 1/80	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	
Goi... — Dys. gr. 6 <sup>e</sup> jour. Nombr. selles sanglantes ( <i>Type Flexner</i> ).  <i>Témoin</i> : Sérum de typhoïdique.	— + 1/150	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
MARL... — Dys. moyenne. 12 <sup>e</sup> j. 10 selles..... ( <i>Type Flexner</i> ).  <i>Témoin</i> : Sérum de rougeoleux.	— + 1/150	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	

Par conséquent, le sérum d'un malade atteint de dysenterie bacillaire, quel que soit le type du germe en cause, est capable de sensibiliser au même taux tous les échantillons de bactilles dysentériques qu'on met à son contact : bien plus, certains germes, catalogués comme différents encore des deux types Shiga et Flexner, tel le pseudo-dysentérique de Kruse (dysenterie des aliénés), tel le bacille que j'ai isolé des dysentériques du 5<sup>e</sup> régiment d'infanterie, présentent la même réaction que les précédents.

Ces résultats sont en concordance manifeste avec ceux que la même étude a fournis avec les sérum d'animaux vaccinés.

De plus, le tableau IV montre l'existence très nette de la sensibilisatrice dans le sérum des sujets dont la dysenterie revêt un caractère grave; elle y est constante. Constante aussi dans les cas de gravité moyenne, mais à un plus faible degré, elle

est parfois décelable dans les atteintes légères; dans certains cas de diarrhée prolongée, survenue en milieu épidémique, elle a pu être constatée.

La sensibilisatrice apparaît vers le 5<sup>e</sup>, 6<sup>e</sup> ou 7<sup>e</sup> jour de la maladie; elle atteint son maximum à la période d'état; elle persiste habituellement pendant la convalescence; les circonstances ne m'ont pas permis de déterminer la durée moyenne de cette persistance.

L'existence de la sensibilisatrice est indépendante de la présence des agglutinines. Certains sérums sont sensibilisateurs avant d'être agglutinants; de plus, un sérum agglutinant pour le Shiga, et non pour le Flexner ou inversement, contient de la sensibilisatrice pour ces deux germes. Puis certains sérums de dysenterie grave, dénués de propriété agglutinante, sont sensibilisateurs à un degré très accusé. Ces faits sont d'ailleurs en accord absolu avec ce que les recherches de MM. Widal et Le Sourd nous ont appris sur le sérum des typhoïdiques.

Enfin, le sérum des malades atteints de dysenterie *ambienne* est dénué de toute sensibilisatrice spécifique vis-à-vis du bacille dysentérique.

### III

#### CONCLUSIONS. — DÉDUCTIONS QUI EN DÉCOULENT

Cette étude comparative sur la sensibilisatrice chez l'homme et l'animal entraîne les conclusions suivantes :

1<sup>o</sup> Dans le sérum des animaux vaccinés contre le bacille dysentérique et celui des malades atteints de dysenterie *bacillaire*, il existe une sensibilisatrice spécifique, décelable par la réaction de fixation de Bordet.

Cette sensibilisatrice est constante chez les malades à la période d'état, dans les atteintes graves et moyennes; elle peut exister dans les cas bénins.

On la voit apparaître en général à la fin du premier septénaire et persister pendant la convalescence.

Elle est indépendante du pouvoir agglutinant.

Dans la dysenterie ambienne, au contraire, son absence est la règle.

2<sup>o</sup> Chez les animaux et les malades, un sérum impressionné

par un échantillon de bacille dysentérique est capable de sensibiliser les bactéries de provenance diverse, à quelque type qu'ils appartiennent. [Types Shiga, Flexner (Manille), Pseudo-dysentérique de Kruse, etc.]

De ces données essentielles, se dégagent quelques déductions intéressant le rôle respectif des bactéries dysentériques dans l'étiologie de la dysenterie.

Tout d'abord, l'absence de fixateur spécifique dans la dysenterie amibienne et sa présence dans la dysenterie bactillaire confirment pleinement les notions antérieurement acquises sur l'individualisation de chacune de ces deux variétés de dysenterie.

Puis le pouvoir sensibilisateur d'un sérum s'exerçant simultanément sur tous les types de bacille dysentérique, engage à émettre sur le rôle de ces germes une conception tant soit peu différente de celle qui tend à être admise actuellement.

Les travaux de Martini et Lentz ont contribué à établir entre le bacille du type Shiga-Kruse, et celui du type Flexner (Manille), une différenciation basée sur les réactions agglutinatives de chacun d'eux : tel sérum qui agglutine le Shiga n'agglutine pas le Flexner ou inversement. Puis chacun de ces germes possède des propriétés fermentatives particulières sur les sucres : alors que le premier ne présente aucune action sur eux, le second, au contraire, fait fermenter la mannite, le maltose, le saccharose; le Flexner fait de l'indol, alors que le Shiga ne possède pas cette propriété.

Bien plus, le type Flexner tend à être démembré à son tour, et à côté de lui on décrivit de nouveaux bacilles dysentériques, faisant fermenter la mannite, n'ayant aucune action sur le maltose, etc.

De cette dichotomie, il résulte que l'on considère actuellement le bacille de type Shiga comme seul *bacille dysentérique*: les bacilles de Flexner (Manille), Jürgens, Strong, le bacille de la dysenterie des aliénés (Kruse) sont au contraire considérés comme des *pseudo-dysentériques*, dont les caractères biologiques ne sont pas toujours identiques à eux-mêmes: d'aucuns (Park, Collins et Goodwin) leur donnent la dénomination de *paradysentériques*.

Pour certains auteurs, les dysenteries graves sont produites

par le Shiga, les dysenteries bénignes par les pseudo-dysentériques; certaines dysenteries sporadiques relèvent uniquement de ces derniers. D'après Lentz, *seul le Shiga serait doué de spécificité, le pseudo-dysentérique ne jouerait qu'un rôle d'agent associé.* donnant toutefois sa note personnelle au caractère de la dysenterie.

Des objections graves peuvent, au nom de la clinique et de l'épidémiologie, être opposées à cette conception, qui tend à faire admettre l'existence de plusieurs variétés de dysenteries bacillaires. Je n'y insisterai pas ici; d'ailleurs, à elles seules, les données précédentes, concernant la sensibilisatrice spécifique, suffisent à l'infirmer.

Elles démontrent surabondamment *qu'au point de vue de la spécificité*, dont la sensibilisatrice est le réactif le plus sensible, les types variés de bacille dysentérique ne diffèrent pas les uns des autres. Ce ne sont pas des germes spécifiquement distincts, pouvant donner lieu à des formes spéciales de dysenterie bacillaire, suivant le bacille envisagé. Les propriétés biologiques qui semblent les séparer sont assez contingentes; si elles empêchent leur identification complète et absolue, elles ne sauraient s'opposer à les faire considérer comme les représentants de plusieurs *races d'un seul et même germe spécifique*. A cet égard, le bacille dysentérique peut être rapproché du vibrion cholérique dont on connaît la variabilité des caractères suivant l'origine des échantillons, et dont la spécificité n'est cependant pas contestée. Il en est de même pour la dysenterie, et il convient de conclure à l'*unité spécifique* des bacilles dysentériques.

# CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES **SÉRUMS HÉMOLYTIQUES**

*Recherches sur le mode d'union du sérum et des substances actives  
avec les globules rouges.*

PAR L. RÉMY,

D<sup>r</sup> en Sciences et en Médecine, chef du Service bactériologique à l'Institut chimique  
et bactériologique de l'Etat à Gembloux (Belgique).

Le présent mémoire faisant partie d'un ensemble de recherches dont nous nous occupons depuis quelque temps déjà sur les anticorps, nous aurions désiré ne pas le livrer à la publicité avant l'achèvement du tout, dont il constitue un des éléments. Des circonstances indépendantes de notre volonté, qui nous empêchent de nous consacrer à ces recherches aussi assidûment que nous le souhaiterions, d'une part, et le travail du Dr Mioni<sup>1</sup> sur les hémolysines naturelles, paru dans ces *Annales* en février dernier, d'autre part, nous ont décidé à distraire actuellement cette publication de nos notes, afin de ne pas perdre le bénéfice de la priorité pour les résultats auxquels nous ont conduit de nombreuses et patientes expériences. L'historique de cette question a été assez souvent fait pour que nous puissions nous dispenser de nous y arrêter. Nous croyons plus utile de nous étendre, à l'occasion, sur certains détails qui permettront de mieux saisir les faits expérimentaux que nous rapporterons.

Dans ce mémoire, nous nous proposons d'étudier d'abord le mode d'union des sérums hémolytiques avec les globules rouges; nous nous occuperons ensuite du mode d'union des substances actives des sérums hémolytiques avec les globules rouges.

*Procédé employé :* Pratiquement, on juge les phénomènes d'hémolyse par la coloration que prend le liquide auquel on ajoute les globules à dissoudre. On peut ainsi noter déjà de très légères différences de teinte, mais il n'est pas possible d'établir entre celles-ci des rapports numériques. On atteint ce

but en se servant du colorimètre de Wolf dont l'emploi repose sur les deux principes suivants :

1<sup>o</sup> Deux liquides de même intensité colorante, examinés sous une épaisseur égale, présentent des teintes identiques ;

2<sup>o</sup> Lorsque deux liquides d'inégale intensité colorante possèdent au colorimètre des teintes identiques, l'intensité de leur coloration est inversement proportionnelle à la hauteur des colonnes du liquide hémolytique contenu dans les éprouvettes placées sous l'oculaire du colorimètre.

Le dosage par voie colorimétrique étant admis dans les laboratoires de chimie, sa valeur ne peut être suspectée. Que fallait-il pour pouvoir l'appliquer à l'étude du mode d'union du sérum et de ses substances actives avec les globules rouges ? L'intensité de la coloration du liquide hémolytique dépendant de la quantité des globules rouges dissous, il fallait établir qu'en présence d'une quantité suffisante de globules rouges la coloration du liquide hémolytique est proportionnelle à la quantité de sérum employé. L'intensité de la coloration dépend en effet du nombre de globules rouges détruits et ceux-ci ne se dissolvent qu'en présence d'une quantité suffisante de substances actives. La mesure de l'intensité de la coloration du liquide où s'est produite l'hémolyse donne donc le moyen de déterminer la quantité de sérum hémolytique que contenait celui-ci. Une formule générale, qui se dégage d'une longue série d'expériences que nous avons entreprises, nous permettra d'être bref tout en rendant mieux notre pensée.

Soit S la quantité de sérum hémolytique capable d'hémolysier la quantité G de globules rouges, en donnant au liquide la teinte T<sup>1</sup>. Faisons varier les quantités de substances actives, sérum et globules, en présence, suivant les termes d'une progression arithmétique croissante, nous aurons :

$$\begin{aligned} 1 \text{ S} + 1 \text{ G} &= T^1 \\ 2 \text{ S} + 2 \text{ G} &= T^2 \\ 3 \text{ S} + 3 \text{ G} &= T^3 \\ 4 \text{ S} + 4 \text{ G} &= T^4 \end{aligned}$$

Si T<sup>2</sup>, T<sup>3</sup>, T<sup>4</sup> sont, respectivement, 2, 3, 4 fois plus colorés que T<sup>1</sup>, l'intensité de leur coloration sera directement proportionnelle aux doses 2 S, 3 S, 4 S de sérum employées. Le colorimètre permet de démontrer qu'il en est réellement ainsi. Pour cela on prélève 4 c. c. des tubes T<sup>1</sup>, T<sup>2</sup>, T<sup>3</sup> et T<sup>4</sup>, on les

dilue dans 50 c. c. d'eau physiologique. Après agitation, on répartit chacune de ces solutions dans des éprouvettes de même diamètre que l'on place sous l'oculaire du colorimètre, et on cherche par tâtonnement à obtenir pour  $T^2$ ,  $T^3$ ,  $T^4$ , des teintes égales à  $T^1$  pris comme unité. Lorsque ce résultat est atteint, on mesure la hauteur de la colonne de liquide contenu dans les 4 éprouvettes et on obtient les chiffres suivants :

$T^1$	= 80 millimètres
$T^2$	= 40 —
$T^3$	= 26,5 —
$T^4$	= 20 —

La hauteur des colonnes 80, 40, 26,5, 20 millimètres est donc inversement proportionnelle à la teinte  $T^1$ ,  $T^2$ ,  $T^3$ ,  $T^4$ .

$T^2$ ,  $T^3$ ,  $T^4$  ont donc une coloration respectivement 2, 3, 4 fois plus intense que  $T^1$ . Or ces colorations, qui augmentent en intensité suivant les termes d'une progression arithmétique croissante, sont obtenues avec des doses 1 S, 2 S, 3 S, 4 S, qui varient dans le même sens. C'est dire que l'intensité de la coloration des liquides hémolytiques est inversement proportionnelle à la hauteur des colonnes 80, 40, 26,5, 20 millimètres, quand celles-ci donnent des teintes identiques au colorimètre, et qu'elle est directement proportionnelle aux quantités de sérum hémolytique employées. Pour obtenir des résultats concordants, il importe de se placer dans des conditions expérimentales convenables, qu'il est aisé de déterminer. Il est nécessaire que les quantités initiales de sérum et de globules 1 S et 1 G, que l'on met en présence, soient telles que leur affinité réciproque soit entièrement satisfaite. Cette condition est irréalisable en pratique, puisque nous ignorons dans quelles proportions les globules et le sérum se combinent. Cette connaissance ne nous serait d'ailleurs d'aucune utilité; on sait en effet qu'une quantité égale de sérum provenant de cobayes différents A, B, C, ne dissout pas des doses égales de globules rouges donnés, fournis par la même poule. Réciproquement, des doses égales de sérum d'un même cobaye ne détruisent pas un nombre égal de globules rouges donnés par des poules différentes. Hâtons-nous d'ajouter qu'on peut tourner la difficulté en s'arrangeant de telle sorte que les quantités croissantes de sérum hémolytique soient toujours en présence d'un léger

excès de globules rouges. Chacune des doses de sérum hémolytique trouvera donc ainsi assez de globules rouges pour satisfaire son affinité, et la teinte du liquide hémolytique foncera proportionnellement aux doses de sérum employées.

Il est une seconde condition que les expériences doivent remplir sous peine d'être frappées de nullité. Il est absolument indispensable que le volume total de sérum hémolytique et de sang dilué reste constant. Il nous paraît superflu d'insister sur ce fait, puisqu'il s'agit de comparer entre elles les teintes communiquées au liquide par le contenu des globules dissous. Il est évident que la comparaison n'est possible que si le contenu globulaire est dilué dans des quantités égales de liquide.

Les expériences que nous rapporterons dans ce mémoire remplissent ces deux conditions. Nous avons chaque fois opéré sur 5,8 c. c. de mélange. Le sang désébriné provenait toujours d'un animal saigné la veille à la carotide; il était lavé à l'eau physiologique avec les précautions habituelles, jusqu'à ce que le liquide surnageant après la centrifugation ne fût plus teinté de rouge; on le diluait alors dans la proportion de 15, 20, 30, etc., pour 85, 80, 70, etc., d'eau physiologique, suivant la quantité qu'il fallait ajouter au sérum hémolytique pour obtenir 5,8 c. c. de mélange. Les tubes qui recevaient ces 5,8 c. c. de mélange s'adaptaient à la centrifuge. Le contact entre le sérum et le sang était maintenu pendant 2 heures à l'étuve 36-37°. On centrifugeait alors, on pipetait le liquide surnageant qu'on laissait couler dans un vase de Berlin; on retirait de celui-ci 4 c. c. que l'on ajoutait à 50 c. c. d'eau physiologique. Après agitation, cette solution était versée dans des éprouvettes de même diamètre et on en déterminait la teinte à l'aide du colorimètre.

Les données qui précèdent ont été appliquées à l'étude du mode d'union du sérum et des substances actives qu'il contient avec les globules rouges.

\*\*

#### *Mode d'union du sérum hémolytique et des globules rouges.*

On sait que le sérum de certains animaux neufs possède la propriété d'hémolysier les globules rouges d'espèces différentes et que le sérum d'animaux vaccinés contre les globules rouges d'espèces différentes acquiert le pouvoir de détruire

ceux-ci. Les quantités de sérum et de globules rouges, qui s'unissent pour produire le phénomène d'hémolyse croissent-elles suivant des proportions constantes ou suivant des rapports multiples. Telle est la question dont nous allons nous occuper.

*1<sup>o</sup> Mode d'union des sérums hémolytiques normaux et des globules rouges.*

Les sérums hémolytiques normaux s'unissent aux globules rouges qu'ils détruisent, suivant des proportions constantes, et l'intensité du phénomène d'hémolyse est proportionnelle aux doses de sérum employées. Mioni (ces *Annales*, février 1905) ayant donné une série d'expériences qui établissent les choses d'une façon indubitable, nous nous dispenserons de rapporter les nôtres; nous en signalerons seulement deux qui nous permettront, d'une part, de montrer la simplicité du procédé mis en œuvre; d'autre part, d'attirer l'attention sur le fait que cette loi est parfois difficile à découvrir quand on n'emploie pas des proportions convenables des réactifs (sérum et globules) mis en présence.

*Expérience I.*

Le sérum hémolytique est fourni par le cobaye neuf. Le sang hémolysé est du sang de poule défibriné, lavé et dilué. Les tubes reçoivent les quantités suivantes de réactifs.

Tubes.	Quantité de sérum alexique de cobaye neuf.	Quantité de sang de poule défibriné, lavé et dilué.	Quantité de liquide hémolytique contenu dans les tubes d'expér.	Hauteur de la colonne du liquide des éprouvettes quand les teintes sont égales.
I....	0.4	5.7, sang dilué 15 pr 83 e. ph.	5.8	80
II....	0.2	5.6, — — — —	5.8	40
III....	0.3	5.5, sang dilué 20 pr 80 e. ph.	5.8	27
IV....	0.4	5.4, — — — —	5.8	19.5

L'éprouvette correspondant au tube I est prise comme unité, nous lui donnons une hauteur de 80 millimètres. Quand la teinte des trois autres éprouvettes est égale à celle du n° 1, on mesure la hauteur des colonnes, et on obtient 80, 40, 27, 19.5. Les tubes II, III, IV sont respectivement 2, 3, 4 fois plus

colorés que le tube I. La quantité d'hématies touchées par le sérum est ainsi proportionnelle au nombre 1, 2, 3, 4, c'est-à-dire aux doses 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, de sérum hémolytique intervenues dans la réaction. Le sérum hémolytique s'unit donc aux globules rouges suivant des proportions constantes.

### *Expérience II.*

Sérum hémolytique fourni par le lapin neuf. Sang défibriné provenant de la poule. Les tubes reçoivent les quantités suivantes de réactifs.

Tubes.	Quantités de sérum asexique, lapin neuf.	Quantité de sang de poule défibriné, lavé et dilué.	Quantité de liquide contenu dans les tubes d'expérience.	Hauteur de la colonne du liquide des éprouvettes quand les teintes sont identiques.
I...	0,1, sér. dilué 1+3 e. ph.	5,7, 45 sg + 85 e. ph.	5,8	80
II...	0,2, — — —	5,6, — — —	5,8	10... 80
III...	0,3, — — —	5,5, 20 sg + 80 e. ph.	5,8	20... 80
IV...	0,4, — — —	5,4, — — —	5,8	61
V...	0,5, — — —	5,3, 25 sg + 75 e. ph.	5,8	49
VI...	0,6, — — —	5,2, 25 — — —	5,8	41

Quand le n° I qui contient 0,1 de sérum dilué (1+3) est pris comme unité et qu'on lui donne une hauteur de 80 millimètres, le n° II qui renferme 0,2 du même sérum présente une teinte égale sous une épaisseur de 10 millimètres: il n'y a donc pas de rapport entre les quantités 0,1, 0,2 de sérum et la hauteur des colonnes 80 millimètres, 10 millimètres. On choisit alors le n° II comme terme de comparaison, on lui donne 80 millimètres de hauteur et on lui compare le tube III. La loi n'apparaît pas encore. Le n° III est ensuite pris comme unité, on en verse 80 millimètres de hauteur dans l'éprouvette et on lui compare les autres tubes IV, V, VI, qui prennent des teintes identiques quand ils ont des hauteurs de 61, 49, 41 millimètres. Il est aisé de voir que 80, 60, 49, 41 sont inversément proportionnels aux nombres 3, 4, 5, 6.

La teinte des tubes III, IV, V, VI est donc proportionnelle aux

nombres 3, 4, 5, 6, et comme celle-ci dépend du nombre des globules détruits, les liquidés hémolytiques ont donc dissous des quantités de globules rouges proportionnelles aux doses 0,3, 0,4, 0,5, 0,6 d'alexine entrée en réaction. Ces deux expériences, instituées avec le sérum hémolytique des animaux neufs, nous permettent de conclure que celui-ci s'unit aux globules rouges suivant des proportions constantes. *En est-il de même du sérum des animaux vaccinés?* M. Mioni a déjà constaté que le sérum des animaux vaccinés contre les globules rouges s'unit à ceux-ci en proportions constantes. Parmi nos nombreuses expériences, qui toutes confirment cette conclusion, nous nous bornerons à en citer deux qui montrent en même temps le rôle important que joue l'emploi des doses de réactifs dans l'étude du mode d'union du sérum des animaux vaccinés avec les globules rouges homologues.

### *Expérience III.*

Sérum hémolytique de cobaye vacciné contre le sang de poule. Le sang défibriné provient de la poule.

Tubes.	Quantité de sérum alexique cobaye-poule dilué, 1 de sérum + 3 eau phys.	Quantité de sang de poule, défibriné, lavé et dilué.	Quantité de liquide hémolytique contenu dans les tubes d'expérience.	Hauteur de la colonne de liquide dans les épruvettes quand les teintes sont identiques.
I....	0,1	5,7, 45 sg + 85 e. ph.	5,8	80
II...	0,2	5,6, —	5,8	40... 80.
III...	0,3	5,5, —	5,8	54.
IV...	0,4	5,4, 20 sg + 80 e. ph.	5,8	41.
V...	0,5	5,3, —	5,8	33.
VI...	0,6	5,2, —	5,8	28.

Remarquons que pour le tube I où la quantité de sérum hémolytique est très faible, la loi n'est pas applicable, mais elle apparaît d'une façon évidente pour les tubes II, III, IV, V, VI, qui croissent dans le même ordre que les quantités 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6 de sérum hémolytique employé.

*Expérience IV.*

Sérum hémolytique de cobaye vacciné contre le sang de lapin. Sang défibriné = sang de lapin.

Tubes.	Quantité de sérum alexine cobaye-lapin dilué, 1 de sérum + 1 eau phys.	Quantité de sang de lapin, défibriné, lavé et dilué	Quantité de liquide hémolytique contenu dans les tubes d'expérience.	Hauteur de la colonne du liquide des éprouvettes quand les teintes sont identiques.
I...	0.1	5.7, 45 sg + 85 c. ph.	5.8	80
II...	0.2	5.6, — — —	5.8	35...80
III...	0.3	5.5, 20 sg + 80 c. ph.	5.8	20...80
IV...	0.4	5.4, — — —	5.8	45...80
V...	0.5	5.3, 25 sg + 75 c. ph.	5.8	65
VI...	0.6	5.2, — — —	5.8	54

La loi apparaît pour les tubes IV, V, VI, qui donnent respectivement 80, 65, 54 millimètres de hauteur. L'intensité de la coloration peut être représentée par les nombres 4, 5, 6 qui sont dans le même rapport que les quantités 0,4, 0,5, 0,6 de sérum ajouté.

Après les expériences que nous venons de rapporter, il nous paraît impossible de ne pas admettre, avec Mioni, qu'il existe un rapport défini entre la quantité de sérum hémolytique d'animal neuf ou vacciné employé, et la quantité de globules rouges qu'il détruit.

\*\*\*

*Mode d'union des substances actives (alexine et sensibilisatrice) des sérums avec les globules rouges.*

Les expériences qui précèdent établissent que les sérums hémolytiques et les globules rouges s'unissent suivant des proportions constantes, mais elles ne nous apprennent pas dans quelle proportion les constituants actifs du sérum se combinent avec les hématies pour produire le phénomène d'hémolyse. L'étude de cette question n'ayant pas encore été abordée, à notre connaissance du moins, avec des procédés rigoureux d'expérimentation, nous nous étendrons avec quelques détails sur cette partie de notre mémoire.

On sait, d'après les recherches de Bordet, que l'animal qui se défend contre l'injection de globules rouges, concentre surtout son activité réactionnelle à la production d'une des deux substances actives du sérum, la sensibilisatrice. Nolf (ces *Annales*, 1900) a montré que le lapin qui réagit contre les globules rouges de poule augmentait peu sa provision d'alexine, tandis qu'il exaltait considérablement la production de sensibilisatrice. Plusieurs expériences, entreprises dans les conditions expérimentales où nous nous sommes placé, nous ont permis de confirmer ces faits. Parmi les lapins vaccinés contre les globules rouges de poule, les uns augmentent très peu et les autres pas du tout la quantité d'alexine contenue dans leur sérum.

L'expérience suivante montre que, dans le sérum de cobaye vacciné contre le sang de poule, la dose d'alexine ne varie guère, tandis que la production de sensibilisatrice s'élève considérablement.

Dans 3 tubes I, II, III, on introduit respectivement :

I. — 0,2 sérum alexique cobaye neuf dilué (1+3), 5,6 de sang de poule désébriné, lavé et dilué (15+85 eau physiologique).

II. — 0,2 sérum alexique dilué (1+3) de cobaye vacciné contre sang de poule, 5,6 de sang comme I.

III. — 0,2 sérum alexique dilué (1+3) cobaye neuf, 0,2 sérum chauffé dilué (1+3) cobaye-poule, 5,4 sang de poule dilué comme I, II.

Lorsque les teintes sont identiques au colorimètre, on obtient, comme hauteur des colonnes de liquide, les chiffres suivants, correspondant respectivement aux tubes I, II, III : 80, 16, 16.

Or II et III contiennent la même dose d'alexine et de sensibilisatrice : seulement en II ces substances sont fournies par le sérum alexique du cobaye vacciné, tandis qu'en III la sensibilisatrice provient du sérum chauffé de ce même cobaye vacciné, et l'alexine, du sérum d'un cobaye neuf. Le nombre de globules dissous est le même dans les deux tubes. Il en résulte que le sérum de ce cobaye vacciné et celui de cobaye neuf avaient la même teneur en alexine.

La dose de sensibilisatrice dans le sérum de cobaye vacciné tube II égale 16, comparée à celle du sérum de cobaye neuf, tube I = 80, est devenue 5 fois plus forte. Non seulement la quantité

d'alexine n'augmente pas après la vaccination contre les globules rouges, mais parfois elle diminue. C'est le cas chez certains cobayes vaccinés contre le sang de lapin, comme le prouve l'expérience suivante :

A 4 tubes I, II, III, IV, nous ajoutons :

I. — 0,1 sérum alexique cobaye-lapin, 5,7 sang de lapin défi-briné, lavé, dilué (20+80 eau physiologique).

II. — 0,2 sérum alexique cobaye-lapin; 5,6 sang de lapin dilué, comme I.

III. — 0,1 sérum alexique cobaye neuf, 0,1 sérum chauffé cobaye-lapin, 5,6 sang de lapin comme I et II.

IV. — 0,2 sérum alexique cobaye neuf, 0,2 sérum chauffé cobaye-lapin, 5,4 sang de lapin comme I, II, III.

La hauteur de la colonne de liquide des éprouvettes correspondant à I, II, III, IV, donne : I = 80, II = 40, III = 40, IV = 20.

Si l'on compare I et III qui contiennent la même quantité de la même sensibilisatrice et une quantité égale de sérum alexique, mais fournie par 2 cobayes différents, on constate que le tube III, qui a reçu 0,1 de sérum alexique cobaye neuf, hémolyse 2 fois plus de globules que le tube I auquel on a ajouté 0,1 de sérum alexique cobaye-lapin. Le rapport entre II et IV, 40/20 indique de même que le sérum alexique des cobayes neufs contient 2 fois plus d'alexine que le sérum de cobaye vacciné contre le sang de lapin. Si même on tient compte du fait que la teneur en alexine du sérum peut présenter des variations individuelles, celles-ci sont trop faibles pour qu'on puisse leur imputer des différences aussi notables que celles que nous venons de signaler.

Nous nous croyons donc fondé à admettre que le sérum des animaux vaccinés ne contient pas plus d'alexine que le sérum des animaux neufs, mais il renferme une dose beaucoup plus considérable de sensibilisatrice.

Or, si le sérum de cobaye et de lapin neufs est généralement hémolytique pour les globules rouges de poule, on rencontre de ces animaux dont le sérum est inactif. D'un autre côté le sérum de certains cobayes neufs est parfois doué de propriétés hémolytiques manifestes vis-à-vis des globules de lapin. Comme tous ces sérums, dont les uns sont hémolytiques, dont les autres ne

le sont pas, contiennent de l'alexine, on doit bien admettre que les premiers diffèrent des seconds par la présence de la sensibilisatrice, comme cela a été constaté par Mioni dans le sérum de bœuf vis-à-vis des hématies de cobayes.

Ces deux substances se trouvent dans le sérum normal dans des proportions que nous ignorons. Nous pouvons représenter le phénomène d'hémolyse qu'elles produisent par le schéma suivant :

A (alexine) + S (sensibilisatrice) détruisent G (globules rouges).

Après la vaccination, la dose d'alexine restant constante, la quantité de sensibilisatrice, dans l'exemple que nous avons rapporté plus haut, devenant 5 fois plus considérable et les globules hémolysés 5 fois plus nombreux, la formule ci-dessus se trouve modifiée comme suit :

A (alexine) + 5 S (sensibilisatrice) dissolvent 5 G (globules rouges).

Il en résulte que le rapport qui règle le mode d'union de l'alexine avec les globules naturellement sensibilisés, n'est pas applicable à la combinaison de cette même alexine avec les mêmes globules sensibilisés par la vaccination. Il semble donc qu'une des conséquences de la vaccination soit la modification du mode d'union de l'alexine avec les globules sensibilisés. En existe-t-il d'autres? Mioni nous a appris que l'addition de sensibilisatrice normale (sérum chauffé de bœuf) au sérum alexique de ce même animal, augmentait notablement le nombre de globules hémolysés de cobaye. Il en résulte donc que, dans le sérum normal de bœuf, la dose de sensibilisatrice ne suffit pas pour sensibiliser le nombre de globules que l'alexine qu'il contient pourrait détruire. Il est facile de s'assurer que, dans le sérum d'animaux vaccinés, l'équilibre s'établit.

Dans 3 tubes I, II, III, on introduit :

I. — 0,2 sérum alexique lapin vacciné contre sang de poule, 5,6 sang de poule dilué (30+70).

II. — 0,2 du même sérum alexique lapin-poule, 0,1 de ce sérum lapin-poule chauffé à 56° et dilué dans la proportion de 1 de sérum pour 3 d'eau physiologique. 5,5 sang de poule désibriné, lavé et dilué, comme I.

III. — 0,2 du même sérum alexique, 0,2 sensibilisatrice

diluée (1+3), 5,4 sang de poule défibriné, comme I et II.

Tube	Sérum alexique lapin-poule	Sensibilisatrice diluée 1 + 3 même lapin-poule.	Sang de poule défibriné, lavé et dilué.	Quantité de liquide dans les tubes d'expérience	Hauteur de la colonne du liquide des éprouvettes quand les teintes sont identiques.
I....	0,2	0	5,6 dilué 25 + 85 c. ph.	5,8	80
II....	0,2	0,4	5,5 — —	5,8	82
III...	0,2	0,3	5,3 — —	5,8	86

Lorsque les teintes sont identiques dans les éprouvettes, le liquide y atteint respectivement les hauteurs suivantes : I : 80, II : 82, III : 86.

L'addition de sensibilisatrice au sérum alexique de lapin vacciné contre le sang de poule n'augmente donc pas le pouvoir hémolytique de celui-ci : au contraire il paraît l'affaiblir, alors même que la dose de sensibilisatrice ajoutée est relativement faible. Il est évident que, par une expérience instituée concurremment avec celle-ci, nous avons eu soin de nous assurer que ces faibles quantités de sensibilisatrice sont suffisantes pour provoquer le phénomène d'hémolyse, quand on les met en contact avec du sérum alexique de lapin neuf. Contrairement à ce que Mioni a signalé pour le sérum normal de bœuf, la sensibilisatrice se trouve en excès dans le sérum de lapin vacciné contre le sang de poule. Ce fait semblait déjà ressortir clairement de l'expérience précédente, où nous avons constaté que, dans le sérum de cobaye vacciné contre le sang de lapin, la dose d'alexine avait considérablement baissé, mais il était prudent de l'établir d'une façon plus précise, par l'expérience actuelle, afin de pouvoir admettre que, dans le sérum d'animaux vaccinés, où la sensibilisatrice est en excès, le phénomène d'hémolyse est sous la dépendance de cette dernière substance.

La vaccination contre les globules rouges produit donc deux modifications importantes dans le sérum :

1° Elle change le mode d'union de l'alexine avec les globules ;

2° Elle augmente la quantité de sensibilisatrice, afin d'assurer au sérum le maximum d'activité que la quantité d'alexine dont il est pourvu lui permet d'atteindre.

Remarquons que ces deux modifications dépendent de la sensibilisatrice puisque, dans la production des phénomènes d'hémolyse, l'alexine d'animaux neufs peut remplacer celle des animaux vaccinés.

Pour atteindre ce double but on admet généralement que la sensibilisatrice augmente en quantité, elle pourrait cependant tout aussi bien varier en intensité et acquérir une affinité plus grande pour les globules d'une part et l'alexine de l'autre.

Des considérations qui précédent, il semblerait résulter que les substances actives des sérums (alexine et sensibilisatrice) s'unissent aux globules en proportions multiples. Les expériences que nous allons rapporter prouvent que, selon l'emploi des doses de réactifs mises en présence, les substances actives s'unissent au sérum, suivant des rapports constants ou variables.

En présence d'un excès de sensibilisatrice, l'intensité du phénomène d'hémolyse est, dans une certaine limite, proportionnel aux doses d'alexine intervenant dans la réaction.

Les tubes I, II, III, IV, V, VI, VII reçoivent 0,5 de sérum chauffé de cobaye vacciné contre le sang de lapin, et les doses croissantes de sérum alexique de cobaye neuf dilué dans la proportion de 4 de sérum pour 9 d'eau physiologique, énumérées dans le tableau suivant :

Tubes.	Quantité de sensibilisatrice sérum chauff cob.lap	Quantités de sérum alexique cob. neuf dilué 4+9 eau phys.	Quantités de sang de lapin défibriné, lavé et dilué.	Quantité de liquide dans les tubes d'expérience	Hauteur de la colonne du liquide des éprouvettes quand les teintes sont identiques.
I...	0,5	0,4	5,2, 15 sg + 85 e. phy.	5,8	80
II...	0,5	0,2	5,1, — —	5,8	60
III...	0,5	0,3	5, — — —	5,8	41
IV...	0,5	0,4	4,9, 20 sg + 89 e. phy.	5,8	30
V...	0,5	0,3	4,8, — —	5,8	25
VI...	0,5	0,6	4,7, — —	5,8	21
VII...	0,5	0,7	4,6, — —	5,8	19

Dans le tube I l'hémolyse est à peine commençante, la dose d'alexine 0,1 d'une dilution au 10<sup>e</sup> est trop faible. La réaction

est manifeste dans les tubes II, III, IV, V, VI, VII et la teinte du liquide est inversement proportionnelle aux nombres 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7. La quantité de globules détruits est donc proportionnelle aux nombres 2, 3, 4, 5, 6, 7, c'est-à-dire aux doses 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, d'alexine ajoutée. Dans le cas présent on ne peut admettre que l'alexine s'unit à la sensibilisatrice suivant les rapports variables 2, 3, 4, 5, 6, 7, car la sensibilisatrice étant en excès, chaque dose d'alexine trouve dans le stock de fixateur la quantité de cette substance qui lui est nécessaire pour former des doses croissantes de sérum hémolytique. Nous retombons donc ainsi dans l'étude du mode d'union du sérum avec les globules rouges qui a fait l'objet de la première partie de ce mémoire.

Le fait que nous venons de signaler, pour l'addition de faibles doses croissantes d'alexines à un excès de sensibilisatrice, se reproduit quand on met en présence de faibles doses croissantes de sensibilisatrice et un excès de sérum alexique. Seulement, dans ce cas, l'hémolyse est proportionnelle aux doses de sensibilisatrice employées.

L'expérience VI ne laisse subsister aucun doute à ce sujet.

Le sérum alexique provient du cobaye neuf, nous en employons une dose constante de 0.2. La sensibilisatrice est fournie par le sérum de cobaye vacciné contre le sang de poule. Le sang défibriné lavé et dilué est donné par la poule.

#### *Expérience VI.*

Tubes.	Quantité de sérum alexique cob. neuf.	Quantités de sensibilisatrice, sér. chauf. coh. poule dilué 1 + 7 eau phys.	Quantités de sang de poule défibriné, lavé et dilué.	Quantité de liquide contenu dans les tubes d'expérience.	Hauteur de la colonne de liquide des éprouvettes quand les teintes sont identiques
I....	0.2	~ 0.4	3.5, sg dil. 15 + 85 e. phy.	5.8	28
II...	0.2	0.2	3.4, — — —	5.8	44
III ..	0.2	0.3	3.3, — 20 + 85 e. phy.	5.8	9
IV...	0.2	0.4	3.2, — — —	5.8	7

La réaction est manifeste dans chacun des tubes I, II, III, IV. La teinte du liquide est inversement proportionnelle aux nom-

bres [28, 44], 9, 7. Les quantités de globules détruits sont entre elles comme les nombres 1, 2, 3, 4, c'est-à-dire comme les doses 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, de sensibilisatrice, qui sont aussi entre elles comme les nombres 1, 2, 3, 4. Dans ce cas aussi, chaque dose de sensibilisatrice trouve dans l'excès d'alexine la quantité de cette substance qui lui est nécessaire pour former des doses croissantes de sérum hémolytique, et nous retombons à nouveau dans l'étude du mode d'union du sérum avec les globules rouges, qui a fait l'objet de la première partie de ce mémoire.

Nous venons de voir qu'en présence de l'une des deux substances actives du sérum, l'intensité du phénomène d'hémolyse croît proportionnellement aux quantités que l'on ajoute de l'autre substance active. Cela ne doit pas nous surprendre, puisque, chaque nouvelle quantité que l'on ajoute de cette dernière puise, dans l'excès de la première, la dose qui lui est nécessaire pour former des quantités de sérum croissant proportionnellement aux doses de substances en défaut que l'on introduit dans la réaction. En présence d'un excès de l'une des deux substances actives du sérum, il ne nous est donc pas possible de rechercher si les constituants de celui-ci s'unissent en quantités égales ou variables pour produire le phénomène d'hémolyse. On se trouve dans les conditions expérimentales que réclame l'étude de cette question, lorsque, en présence de la dose minima active de l'un des deux constituants, que l'on maintient constante, on fait intervenir des quantités croissantes de l'autre constituant du sérum. Le point le plus délicat des expériences que l'on institue dans ces conditions, c'est d'opérer avec la dose minima d'alexine et de sensibilisatrice qui peut provoquer le phénomène d'hémolyse. Un grand nombre d'essais préliminaires doivent être effectués dans chaque expérience pour déterminer ces doses limites. Nous ne les rapporterons pas ici, nous nous contenterons de donner deux expériences qui prouvent que l'alexine et la sensibilisatrice peuvent s'unir en quantité variable pour produire le phénomène d'hémolyse.

\*\*\*

La dose la plus faible du fixateur capable de sensibiliser les globules rouges, se combine à des quantités variables d'alexine et l'intensité du phénomène d'hémolyse est, dans ce cas, directe-

ment proportionnelle aux quantités d'alexine intervenues dans la réaction. L'expérience suivante ne laisse subsister aucun doute à ce sujet.

La sensibilisatrice est fournie par un cobaye vacciné contre le sang de lapin. On en emploie une dose constante, 0,2, de dilution (1 de sérum chauffé 4 à 56° pour 7 d'eau physiologique). Les doses croissantes d'alexine proviennent du sérum alexique de cobaye neuf dilué (1 de sérum pour 9 d'eau physiologique). Le sang hémolysé est du sang de lapin désébriné lavé et dilué.

### *Expérience VII.*

Tubes.	Doses de sensibilisatrice diluée 1+7 e. phy., serum chauff. cob.-lap.	Doses d'alexine (cob. neuf) diluée 1+9. E. phy.	Quantités de sang de lapin désébriné, lavé et dilué.	Quantité de liquide dans les tubes d'expérience.	Hauteur de la colonne du liquide des éprouvettes quand les teintes sont identiques.
I....	0,2	0,1	3,3, dilut. 15 + 85 e. phy.	5,8	pas d'hémolyse.
II...	0,2	0,2	5,4. — —	5,8	pas d'hémolyse.
III...	0,2	0,3	5,3, — —	5,8	80, très légère.
IV...	0,2	0,4	5,2, — —	5,8	10..... 80
V...	0,2	0,5	5,1, — —	5,8	65
VI...	0,2	0,6	5, — —	5,8	54
VII...	0,2	0,7	4,9, — —	5,8	47
VIII.	0,1	0,8	4,9, — —	5,8	pas d'hémolyse.

0,2 de sensibilisatrice (dilué 1+7) représente bien la dose la plus faible de sensibilisatrice capable de donner le phénomène d'hémolyse, car une expérience instituée concurremment avec celle-ci nous a appris, tube VIII, que 0,1 de sensibilisatrice cobaye-lapin (dilué 1+7) ne suffisait pas pour sensibiliser les globules rouges de lapin, puisque l'addition de 0,8 d'alexine cobaye (dilué 1+9) ne produit pas d'hémolyse. En présence de la dose la plus faible de sensibilisatrice qui puisse sensibiliser les hématies de lapin, 0,1 et 0,2 de sérum alexique (dilué 1+9) sont sans action. Celle-ci est ébauchée avec 0,3 de cette même dilution; elle est manifeste avec 0,4. Donc 0,2 de sensibilisatrice (diluée 1+7) et 0,4 de sérum alexique cobaye neuf (dilué 1+9)

représentent bien les doses les plus faibles de ces deux réactifs qui sont aptes à produire le phénomène d'hémolyse. Si dans ces conditions nous ajoutons des doses croissantes d'alexine (diluée 1+9), 0,5, 0,6, 0,7 nous constatons que la quantité de globules détruits, qui est en raison inverse des nombres 80, 65, 54, 47 figurés dans la dernière colonne, croît proportionnellement aux quantités 0,4, 0,5, 0,6, 0,7 de sérum alexique employé.

Maintenue constante, la dose (0,2) la plus faible de fixateur (dilué 1+7) capable de sensibiliser les globules rouges de lapin, a donc fixé des quantités d'alexine suivant les termes d'une progression arithmétique 4, 5, 6, 7, car les nombres 80, 65, 54, 47 qui représentent l'intensité du phénomène d'hémolyse sont entre eux comme 4, 5, 6, 7. L'intensité du phénomène d'hémolyse est donc proportionnelle aux quantités d'alexine présente dans la réaction.

Dans ces conditions la dose la plus faible de fixateur capable de sensibiliser les globules rouges de lapin s'est donc unie à des doses variables d'alexine.

\* \* \*

La dose la plus faible d'alexine capable de provoquer le phénomène d'hémolyse, s'unit à des quantités variables de sensibilisatrice, et l'intensité du phénomène d'hémolyse est proportionnelle aux quantités de sensibilisatrice entrées en réaction.

#### *Expérience VIII.*

Le sérum alexique est du sérum dilué (1+14 d'eau physiologique) de lapin neuf, on en emploie une dose constante 0,1. La sensibilisatrice est fournie par le sérum chauffé de lapin vacciné contre le sang de poule, il est également dilué dans la proportion de 1+14 d'eau physiologique, on en prélève des doses croissantes, 0,1, 0,2, etc.; les globules rouges proviennent du sang de poule désébriné, lavé et dilué.

Tubes	Doses de sér. a exiq. dilué lap neuf. 1+14 e. ph.	Doses de sensibilisatr. diluée kap. poule. 1+14 e. ph.	Quantité de sang de poule défibriné, lavé et dilué.	Quantité de liquide conten. dans les tubes d'expérience	Hauteur de la colonne du liquide des éprouvettes quand les teintes sont identiques.
I....	0,1	0	3,7, dil. 10 sg + 90 e. ph.	3,8	pas d'hémolyse
II...	0,1	0,1	5,6, — — —	3,8	pas d'hémolyse
III...	0,1	0,2	5,3, — — —	3,8	80
IV...	0,1	0,3	3,4, — — —	3,8	32... 80
V...	0,1	0,4	5,3, dil. 13 sg + 85 e. ph.	3,8	60
VI...	0,1	0,5	5,2, — — —	3,8	49
VII...	0,1	0,6	5,1, — — —	3,8	41
VIII...	0,1	0,7	5,0, — — —	3,8	35
IX...	0,1	0,8	4,9, — — —	3,8	27

0,1 d'alexine (diluée 1+14) est bien la plus petite quantité d'alexine qui puisse produire le phénomène d'hémolyse, car additionnée à du sang de poule défibriné et lavé, elle est inactive (tube II). La dose de sensibilisatrice capable de produire une action hémolytique appréciable (tube IV) est bien 0,3 de la dilution (1+14 d'eau physiologique), car 0,1 de cette même dilution (tube II) est incapable à provoquer l'hémolyse alors que 0,2 (tube III) la font commencer.

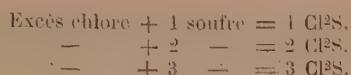
Avec 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, etc. de sensibilisatrice diluée (1+14), l'hémolyse apparaît nettement, et de plus il est aisé de voir que la teinte du liquide contenu dans les éprouvettes, qui est inversement proportionnelle aux nombres 80, 60, 49, 41, 35, croît suivant les nombres 3, 4, 5, 6, 7, de même que les doses de sensibilisatrice 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, sont entre elles comme 3, 4, 5, 6, 7. En présence d'une dose d'alexine à la limite minima d'activité, l'hémolyse croît donc proportionnellement aux doses de sensibilisatrice ajoutées, c'est-à-dire que la dose d'alexine à la limite minima d'activité est capable de s'unir à des doses variables de sensibilisatrice. Ces deux expériences sont intéressantes parce qu'elles nous apprennent qu'en présence d'une faible dose de sensibilisatrice, l'alexine peut suppléer à celle-ci et réciproquement. Si, comme on l'admet actuellement, l'orga-

nisme emploie le même processus pour réagir contre l'injection de bactéries et de globules rouges, nous nous expliquons comment de faibles doses de sérum préventif parviennent à préserver l'animal réceptif contre l'injection de doses mortelles de bactéries. Le sérum préventif contient un excès de sensibilisatrice et celle-ci, arrivant dans l'organisme neuf, y trouve non-seulement la dose d'alexine capable de faire complètement son affinité, mais elle rencontre un excès d'alexine susceptible d'augmenter considérablement son pouvoir bactéricide. Dans le sérum des animaux vaccinés, où l'alexine est en déficit par rapport à l'excès de sensibilisatrice, cette dernière intervient suivant des proportions variables; elle confère ainsi au sérum son maximum d'effet utile et, comme nous l'avons montré dans l'expérience VIII, l'hémolyse est proportionnelle à la quantité de sensibilisatrice contenue dans le sérum.

Dans le sérum des animaux neufs, auxquels on injecte du sérum préventif, la sensibilisatrice se trouve en déficit et c'est l'alexine qui intervient alors suivant des rapports variables, ce qui renforce considérablement le pouvoir préventif de la quantité de sensibilisatrice introduite. Ceci nous explique également comment les faibles doses de fixateur que l'on rencontre normalement dans le sérum de certains animaux, suffisent à leur conférer l'immunité naturelle.

A un autre point de vue, le mode d'union des substances actives du sérum avec les globules rouges mérite d'attirer l'attention, parce qu'elle présente une certaine analogie avec ce que l'on connaît en chimie des combinaisons du chlore et du soufre qui obéissent à la loi des proportions multiples.

Le chlore se combine avec le soufre et peut donner  $\text{Cl}_2\text{S}$  (bichlorure de soufre) et  $\text{Cl}_2\text{S}^2$  (protochlorure de soufre). On voit que le poids minimum du chlore  $\text{Cl}_2$  (71) qui peut s'unir au soufre, se combine tantôt à S (32), tantôt à  $\text{S}^2$  (64) de soufre, c'est-à-dire à des poids variables de soufre, c'est donc bien la loi des proportions multiples qui régit cette combinaison. Le bichlorure de soufre  $\text{Cl}_2\text{S}$  et le protochlorure de soufre  $\text{Cl}_2\text{S}^2$  se préparent en faisant passer un courant de chlore sur du soufre. Lorsque le chlore est en excès, on obtient  $\text{Cl}_2\text{S}$ , bichlorure de soufre, dont le nombre de molécules augmente proportionnellement au nombre d'atomes de soufre.



En présence d'un excès de chlore, le nombre de molécules de bichlorure de soufre est proportionnel au poids de soufre employé, de même qu'en présence d'un excès de sensibilisatrice le nombre de globules détruits est proportionnel à la quantité d'alexine intervenue dans la réaction.

Eu égard à cette ressemblance qui existe entre les combinaisons du soufre et du chlore, d'une part, et l'union des substances actives du serum avec les globules rouges d'autre part, on serait tenté d'appliquer aux phénomènes d'hémolyse les lois qui président aux combinaisons chimiques.

Nous croyons cependant qu'il serait téméraire, à l'heure actuelle, d'identifier les deux réactions. Le soufre et le chlore sont deux corps dont la nature chimique des combinaisons est nettement déterminée : la loi des rapports constants ou variables peut donc leur être appliquée. Dans les phénomènes d'hémolyse, au contraire, nous nous trouvons en présence de substances albuminoïdes, et l'on sait que les réactions que celles-ci produisent sont respectivement considérées par les chimistes, les physiciens et les biologistes comme des phénomènes chimiques, physiques ou physico-chimiques. En tout cas, on ne connaît pas les lois auxquelles obéissent les combinaisons qu'elles provoquent.

Dans ces conditions, nous nous bornerons à poser les conclusions suivantes, qui réservent complètement le problème de la nature des combinaisons des substances actives du serum :

1<sup>o</sup> En présence d'une quantité suffisante de globules rouges, l'intensité du phénomène d'hémolyse est proportionnelle aux doses de serum hémolytique employées;

2<sup>o</sup> En présence d'un excès d'alexine, l'intensité du phénomène d'hémolyse est proportionnelle aux doses de sensibilisatrice intervenues dans les réactions;

3<sup>o</sup> En présence d'un excès de sensibilisatrice, l'intensité du phénomène d'hémolyse est proportionnelle aux doses d'alexines mises en œuvre;

4<sup>o</sup> En présence de la quantité minima d'alexine capable de provoquer la globulolyse, et de doses croissantes de sensibilisa-

trice, l'intensité du phénomène d'hémolyse est proportionnelle aux doses de sensibilisatrice; c'est-à-dire que la quantité constante d'alexine à sa limite d'activité s'unit à des doses variables de sensibilisatrice;

5<sup>o</sup> En présence de la quantité minima de sensibilisatrice capable de provoquer le phénomène d'hémolyse et de doses variables d'alexine, l'intensité du phénomène d'hémolyse est proportionnelle aux doses d'alexine. Autrement dit la dose constante de sensibilisatrice à sa limite d'activité peut se combiner à des doses variables d'alexine.

Dans un prochain mémoire, nous rechercherons si ces lois qui règlent les phénomènes d'hémolyse peuvent nous permettre de doser les substances actives des sérum hémolytiques.

SUR L'ORIGINE INTESTINALE  
DE  
L'ANTHRACOSE PULMONAIRE  
PAR

P. VANSTEENBERGHE ET GRYSEZ

(Travail du laboratoire de M. Calmette. (Institut Pasteur de Lille.)

L'anthracose pulmonaire, expérimentale ou pathologique, est considérée actuellement comme le résultat de la pénétration directe des poussières de charbon dans les voies respiratoires et les alvéoles, d'où elles passent par phagocytose dans le parenchyme pulmonaire.

Le nez, le larynx, la trachée, les bronches sont admirablement défendus contre une semblable infiltration de poussières; tous les auteurs le reconnaissent, mais ils admettent que cette barrière physiologique peut être franchie quand il existe des tares antérieures de l'appareil pulmonaire (malformations, végétations, respiration uniquement buccale), ou quand la proportion des particules solides en suspension dans l'air respiré est anormalement élevée.

Guidé par ses conceptions nouvelles sur la genèse de la tuberculose pulmonaire de l'homme et des animaux, M. Calmette nous a suggéré l'idée d'étudier le mécanisme de l'infiltration du parenchyme pulmonaire par les poussières de charbon.

Sans nier que, dans certains cas pathologiques, la pneumoconiose puisse être provoquée par l'inhalation directe, nous avons pu nous convaincre, par les expériences qui vont suivre, qu'elle résulte le plus souvent, sans aucun doute, de l'absorption des poussières par l'intestin.

Expérimentalement, en effet, le meilleur procédé pour produire une anthracose pulmonaire typique chez le cobaye adulte consiste à mélanger à ses aliments de l'encre de Chine ou de la poussière de charbon.

Les animaux, sacrifiés vingt-quatre ou quarante-huit heures

après un seul repas semblable, présentent dans le parenchyme pulmonaire des îlots noirâtres (granulie anthracosique) disséminés surtout dans les lobes supérieurs et le bord des lobes inférieurs. Les ganglions mésentériques sont, dans ce cas, indemnes, tandis que ceux du médiastin sont tuméfiés et noirs.

La même expérience, faite chez des cobayes jeunes, conduit à des résultats complètement différents : les poumons sont indemnes, alors que les ganglions mésentériques sont absolument infiltrés de particules charbonneuses.

Les mêmes faits se reproduisent quand on substitue, à la poussière de charbon ou à l'encre de Chine, du carmin en suspension dans l'eau, ou quand on introduit directement une de ces substances dans l'estomac, à l'aide de la sonde œsophagiennne.

Le mécanisme de cette imprégnation pulmonaire nous semble facile à expliquer. Le charbon introduit dans l'intestin s'engage normalement dans les voies lymphatiques : chez le jeune cobaye, les ganglions mésentériques lui opposent une barrière qu'il ne peut franchir ; chez l'adulte, au contraire, les ganglions mésentériques ne jouent pas le même rôle d'arrêt ; les poussières phagocytées ou libres sont déversées dans le canal thoracique, puis dans la circulation générale et sont amenées par la voie sanguine dans les capillaires du poumon.

Ce passage des poussières dans les voies lymphatiques peut s'étudier plus facilement si l'on introduit directement le noir de fumée dans les séreuses, telles que le péritoine, par exemple. Dans ce cas, le charbon est rapidement absorbé par les lymphatiques de l'épiploon.

Chez le cobaye adulte, sacrifié vingt-quatre heures après une seule injection d'un centimètre cube d'encre de Chine, on constate une granulie anthracosique nette, localisée, comme nous l'avons vu plus haut, au poumon, avec intégrité des ganglions mésentériques. Cette anthracose diminue si on laisse l'animal vivre quarante-huit heures et le lobe supérieur est alors seul atteint ; les ganglions trachéo-bronchiques se montrent, en pareil cas, gros et infiltrés de charbon. L'imprégnation pulmonaire diminue encore, mais persiste aux sommets, si on ne tue l'animal que cinq jours après l'injection ; les ganglions trachéo-bronchiques sont alors seuls gorgés de charbon.

Chez le cobaye jeune, on obtient les mêmes résultats que lorsqu'on fait ingérer le noir de fumée mélangé aux aliments. Sacrifiés vingt-quatre heures, quarante-huit heures ou cinq jours après une injection d'un centimètre cube d'encre de Chine dans le péritoine, jamais les poumons de ces jeunes animaux ne présentent la plus minime trace d'infiltration; et *les ganglions mésentériques sont toujours gorgés de noir.*

Si, au lieu de se borner à faire une inoculation unique d'encre de Chine dans le péritoine, on répète chaque jour, pendant une semaine par exemple, de semblables injections, on constate que tous les organes lymphatiques sont gorgés de noir et, en particulier, la moelle osseuse.

*Chez l'adulte, l'antracose pulmonaire est totale et l'engorgement trachéo-bronchique complet; chez le jeune, le poumon reste indemne.*

La conclusion de cette première série d'expériences est qu'il est possible de rendre un animal parfaitement anthracosique sans le soumettre à des inhalations répétées de poussières de charbon. La déglutition de noir de fumée, comme l'injection intra-séreuse d'encre de Chine, suffit à produire la localisation des poussières dans le parenchyme pulmonaire du cobaye adulte.

\* \* \*

Il reste maintenant à rechercher si ce mode de pneumoco-niose intervient dans la genèse de l'antracose normale.

Si l'on place des animaux dans un appareil à inhalation, analogue à celui de Claisse et Josué, composé d'une grande cage de verre dans laquelle on fait brûler une lampe à essence de téribenthine, on constate qu'après une séance d'inhalation d'une certaine durée, les animaux sacrifiés ont les poumons gorgés de noir : le nez, la bouche, les bronches sont en partie remplis de charbon.

Dans ces conditions, qui ne paraissent pas devoir se réaliser en pratique, l'antracose, d'origine respiratoire, se traduit par un envahissement des alvéoles, mais on constate que les particules de noir de fumée ne pénètrent pas à l'intérieur du parenchyme.

Si, au contraire, la séance d'inhalation a été plus courte, il

n'en est plus de même, et chez le lapin en particulier, qui respire par le nez, on ne constate parfois aucune trace d'imprégnation pulmonaire : on retrouve les poussières de charbon dans le nez, dans le pharynx, dans l'œsophage et sur les replis de l'épiglotte, *jamais dans la trachée*.

C'est en nous plaçant dans ces dernières conditions, que nous avons cherché à nous rendre compte de la part qui revenait à la voie digestive et à la voie respiratoire dans le transport des poussières de l'air jusqu'aux poumons.

Pour cela, dans une nouvelle série d'expériences, nous avons fermé aux poussières de charbon l'accès des voies digestives. Ce résultat a été obtenu en pratiquant chez nos animaux la ligature ou le capitonnage de l'œsophage. Ces opérations sont aisées chez le lapin et le cobaye ; elles ne s'accompagnent que d'un choc immédiat, insignifiant, si l'on a pris soin de ne léser aucun filet nerveux.

Les lapins, dont l'œsophage avait été obturé, n'ont pas présenté d'anthracose à la suite d'une séance d'inhalation assez prolongée, alors que les poumons des lapins témoins étaient nettement anthracosiques. Le noir de fumée était arrêté au-dessus de la ligature et n'avait pu être repris par les voies lymphatiques de l'appareil digestif pour être transporté au poumon.

Cette expérience, très démonstrative, demande, pour réussir, une séance d'inhalation un peu prolongée et il faut choisir des animaux respirant par le nez. Si on force la dose de noir de fumée ou qu'on prolonge outre mesure l'inhalation, l'anthracose se produit chez les animaux opérés comme chez les témoins. Il en est de même, et avec une grande intensité, si on lie le pneumogastrique, fait déjà établi d'ailleurs par Claisse et Josué.

Ce premier résultat obtenu, nous avons fermé aux poussières de l'air l'accès des voies respiratoires, en conservant l'intégrité des voies digestives.

Pour cela, après trachéotomie basse, nous avons introduit, dans l'une des deux grosses bronches d'un lapin, un tampon de coton assez gros pour l'obturer complètement (dans une de nos expériences, nous avons même pu placer notre tampon dans une bronche de deuxième ordre). Nous avions ainsi un

animal dont un poumon était en relation normale avec l'air, tandis que l'autre en était complètement isolé, ou dont un même poumon présentait un lobe en contact avec l'air et un lobe isolé.

Dans ces conditions, après avoir soumis l'animal à une séance prolongée d'inhalation, nous l'avons sacrifié et nous avons fixé aussitôt deux lobes pulmonaires symétriques appartenant l'un au poumon intact, l'autre au poumon isolé du contact de l'air.

Ces deux lobes étaient nettement anthracosiques.

Le poumon libre présentait des granulations dans les bronches et la paroi externe des alvéoles, et, de distance en distance, dans le parenchyme.

Le poumon isolé de l'air montrait des granulations charbonneuses *intra-parenchymateuses*, tandis que les bronches et les alvéoles étaient complètement vides.

\* \* \*

Il résulte donc de ces faits que, chez un animal soumis à l'inhalation des poussières charbonneuses, la ligature de l'œsophage atténue ou empêche l'anthracose. Au contraire, l'obturation d'une bronche n'empêche pas cette anthracose de se produire dans la partie du tissu pulmonaire qui n'est plus en contact avec l'air.

Par suite, la conclusion s'impose que l'*anthracose physiologique est due, dans la plupart des cas, à l'absorption intestinale des particules charbonneuses*.

Celles-ci, arrêtées normalement dans les fosses nasales et le pharynx, sont dégluties avec la salive et le mucus nasal, arrivent dans les voies digestives, sont reprises par les lymphatiques, déversées dans la grande circulation, et de là disséminées dans le poumon, exactement comme MM. Calmette et Guérin l'ont constaté pour les bacilles tuberculeux ingérés par les animaux adultes<sup>1</sup>.

Si les ganglions trachéo-bronchiques sont sains, le poumon se débarrasse rapidement de ces corps étrangers. Si, au contraire, l'appareil lymphatique a été lésé antérieurement ou engorgé par des inhalations trop fréquentes, ce qui est le cas

1. Ces *Annales*, 25 octobre 1903.

chez les ouvriers mineurs par exemple, l'antracose définitive apparaît.

Les différences constatées entre les animaux adultes et jeunes sont intéressantes à rapprocher de ce que l'on sait de l'antracose chez l'homme.

Toutes les causes de sénilité des ganglions lymphatiques ou d'infections répétées de ces organes favorisent l'infiltration pulmonaire.

# Essais de culture du bacille lépreux.

PAR M. P. ÉMILE-WEIL

(Travail du laboratoire municipal de l'Hôpital Saint-Louis.)

---

Depuis Hansen, qui montra en 1874 la présence d'un bacille en quantité innombrable dans les lésions lépreuses, les progrès réalisés dans l'étude biologique de ce microorganisme ont été des plus minimes. Les travaux n'ont pas fait défaut, cependant ; mais jusqu'à présent, on n'est parvenu ni à donner la lèpre aux animaux ni à cultiver sûrement le bacille lépreux<sup>1</sup>.

En effet, la plupart des auteurs n'ont pu obtenir aucune culture du bacille ; certains, il est vrai, prétendent l'avoir réalisée, souvent avec facilité. Les milieux utilisés dans les cas positifs ont été parfois les milieux ordinaires, parfois ceux qui permettent le développement du bacille de Koch, soit enfin des milieux complexes (bouillon et gélose faits avec du placenta humain, sérum de bœuf, gélose-sang de lapin, etc.). Mais les caractères attribués aux cultures sont par trop divers. La culture est pauvre ou riche, se développe vite ou lentement ; les microbes sont généralement considérés comme aérobies, plus rarement comme anaérobies. Il n'est pas jusqu'aux caractères tinctoriaux des bacilles, caractères dont la constance est si grande dans les produits lépromateux, qu'on ne décrive de diverses façons pour les bacilles cultivés. Suivant les auteurs, ils se colorent ou ne se colorent pas par les bleus ordinaires, gardent le Ziehl ou le perdent sous l'action des acides, même faibles, se teintent ou non par la méthode de Gram.

D'ailleurs, les conditions dans lesquelles on a tenté les cultures étaient souvent défectueuses : certains auteurs sont partis des organes lépreux à l'autopsie (or, l'on sait la fréquence des infections secondaires terminales) ; d'autres se sont servis du mucus nasal, divers enfin de lésions cutanées et d'ulcérations :

1. Il semble cependant que tout récemment, M. Ch. Nicolle ait réussi à inoculer la lèpre au bonnet chinois (*Macacus sinicus*). Un nodule parut au 62<sup>e</sup> jour, au point d'inoculation, et dans l'élément excisé, au 75<sup>e</sup> jour, on trouvait de gros leucocytes mononucléés renfermant des bacilles de Hansen. (*Ac. des Sciences*, 2 février 1903.)

rien d'étonnant que l'on parle de cultures infectées. Mais y a-t-il eu culture? De tout cet ensemble de faits, l'impression qui se dégage est qu'on n'a pas cultivé le bacille de Hansen; que les auteurs qui ont cru au succès de leurs tentatives, cultivaient des germes vulgaires, et que ceux dont la technique a été plus rigoureuse n'ont abouti qu'à des résultats négatifs.

Pendant un an environ, nous nous sommes efforcé d'obtenir des cultures du bacille de Hansen, au laboratoire municipal de l'hôpital Saint-Louis. Notre ami, le docteur Sabouraud, ne nous y a ménagé ni ses affectueux encouragements ni ses conseils techniques; c'est à lui que nous sommes redevable de l'idée de la culture dans l'œuf. Ce sont ces essais que nous rapportons ici, en nous excusant d'entrer dans tant de détails minutieux de technique; mais, dans l'espèce, c'est le manuel opératoire qui importe le plus.

## I

Pour réussir à cultiver un microbe, il faut réunir diverses conditions : *a)* partir d'un germe doué de vitalité et de végétabilité; *b)* le mettre dans des conditions favorables de température, d'alimentation.

La détermination de chaque détail est importante, quand on a affaire à un microbe hautement différencié, et qui se développe difficilement hors de l'organisme vivant.

## A. — PARTIR D'UN GERME DOUÉ DE VITALITÉ ET DE VÉGÉTABILITÉ.

En ce qui concerne le bacille de Hansen, la question du germe est capitale. C'est le premier point que nous avons étudié, et nos conclusions sont ici absolument nettes.

Les cas de lèpre anesthésique ne conviennent pas; les bacilles y sont trop rares, parfois on ne les trouve avec quelque abondance que dans les organes hématopoïétiques ou le testicule. Cette forme clinique de lèpre, tantôt survient d'emblée, quand l'infection est relativement minime, tantôt succède à la lèpre tuberculeuse, dont elle constitue en quelque sorte un mode de guérison.

*Il faut utiliser exclusivement, pour la culture, les cas de lèpre tuberculeuse.* Dans ceux-ci, les organes fourmillent

de bacilles; on pourrait donc croire qu'ils fournissent une semence dans de bonnes conditions: mais, outre que les autopsies de lèpre sont exceptionnelles dans nos climats, la fréquence des infections terminales, la coexistence souvent signalée de l'infection tuberculeuse, la présence éventuelle de bacilles acido-résistants, le délai légal avant l'autopsie, sont autant de raisons pour ne pas trop se fier à l'ensemencement viscéral. C'est aux lésions cutanées, aux tubercules, qu'il faut s'adresser: mais tous ne conviennent pas également. Naturellement, il faut rejeter les lésions ulcérées, presque toujours infectées. C'est uniquement aux lésions nodulaires récentes que l'on doit recourir. En effet, tandis que le léprôme jeune contient une énorme quantité de bacilles, rapidement colorés par le Ziehl à froid, et doués d'une forte acido-résistance, gardant le Gram, ne se teignant pas par les bleus, le léprôme vieillissant renferme des microbes granuleux, fragmentés, qui se colorent mal, perdent facilement le Gram par l'iode ou le Ziehl sous l'action des acides, et prennent même les bleus dans les doubles colorations<sup>1</sup>. Ces réactions métachromatiques, ces altérations du bacille, doivent être interprétées comme des caractères de dégénérescence. Il est curieux de voir combien rapidement, après une poussée de tubercules, l'organisme se défend: dans des formes tuberculeuses très intenses, on peut ne trouver que des bacilles granuleux, altérés. Il faut donc de toute nécessité partir d'un léprôme jeune, où les bacilles soient doués de vitalité; ce dont, jusqu'à nouvel ordre, on peut juger, semble-t-il, par l'appréciation des réactions tinctoriales.

Mais est-il possible d'obtenir un matériel non souillé, en partant de la peau? Nous pensions la chose aisée. Les recherches de Sabouraud nous avaient fait connaître la stérilité relative de la peau normale: il s'agissait de voir comment se comportaient les téguments chez les lépreux. Disons immédiatement que nos ensemencements dans les milieux les plus divers n'ont point été infectés par les germes vulgaires plus d'une fois sur dix. Voici comment on doit procéder:

a) *Choix du léprôme.* On s'adressera de préférence à un malade qui vient de faire une poussée récente de tubercules

1. P. ÉMILE-WEIL, Les réactions colorantes du bacille de la lèpre. (*C. R. Soc. Biol.*, 10 juin 1905, p. 977.)

lépreux. Ceux-ci étant plus abondants au visage, ce sont des lésions de la face qui nous ont servi. On prendra un nodule saillant, recouvert d'un épiderme intact, enchâssé dans le derme; de couleur rougeâtre ou jaunâtre; ceux qui nous ont fourni les meilleurs résultats avaient l'aspect de furoncles anciens, n'ayant point abouti à l'élimination du bourbillon et présentaient un centre ramolli, visible par transparence. Ils contenaient du pus presque liquide, du suc lépreux, constitué par les cellules lépreuses, et le bacille à réactions orthochromatiques, sans microbes étrangers.

b) *Technique d'ensemencement.* On lave la surface du léprôme avec de l'éther, qui dégrasse la peau et nettoie la surface épidermique. On abrase les couches superficielles du nodule avec un scarificateur stérilisé, et on enfonce dans la masse l'épromateuse une pipette stérile à grosse effilure, avec laquelle on enlève un court cylindre de tissu morbide jaunâtre, véritable purée bacillaire. Le tissu doit monter de lui-même dans l'effilure; il ne faut pas l'aspirer, de crainte qu'avec lui on n'entraîne quelques traces de sang, ce qui nous a paru toujours empêcher le développement des cultures. C'est pourquoi *il ne faut pas faire deux prises au même nodule*. L'évidement du léprôme donnant d'ordinaire lieu aussitôt à un saignement sanguin. L'opération ainsi conduite n'est à aucun degré douloureuse.

L'ensemencement peut être fait dans les tubes de culture, soit par frottis, soit mieux en écrasant avec une spatule le suc lépromateux à la surface du milieu. Dans ces conditions, nous l'avons dit, une fois sur dix essais environ, nous avons obtenu le développement de germes vulgaires; dans les neuf autres, tantôt les milieux demeuraient stériles et, au bout d'une huitaine de jours, on ne retrouvait plus que quelques bacilles de Hansen, granuleux, presque incolorables. L'immense quantité de germes semés avait disparu *in vitro*. D'autres fois, avec une fréquence variant suivant le milieu de culture, on voyait apparaître et se développer quelques colonies de bacilles de Hansen.

Pour notre travail, nous n'avons eu recours qu'à un seul malade, qui présentait de belles lésions tuberculeuses de la face, et qui fit quelques poussées sous nos yeux. Parmi la vingtaine de lépreux soignés à l'hôpital Saint-Louis, lui seul nous offrait, et seulement par moments, un germe doué de vitalité. Nos cul-

tures n'ont jamais réussi qu'en partant de ses lésions et de ses lésions récentes. Au bout d'un certain temps, nous pouvions, par l'examen du frottis d'ensemencement, prévoir le sort de nos cultures. La notion la plus nette, qui se dégage pour nous de nos recherches, est l'importance de la graine: Le lépreux, même profondément atteint, dans les formes les plus graves, arrivé à détruire une quantité prodigieuse de bactéries. La vitalité du microbe tiré du corps humain est donc faible, du moins la plupart du temps, en dehors des poussées. D'autre part, la végétabilité du bacille est minime, puisque la contagion, du moins dans nos pays, est exceptionnelle, au point qu'à Saint-Louis on ne l'observe jamais, alors que le malade rejette des milliers de bacilles par ses sécrétions nasales ou autres. Il n'y a donc rien d'étonnant qu'un microbe, qui pousse mal dans le milieu vivant, se développe difficilement *in vitro*, dans des milieux où il doit d'abord s'acclimater. Nos cultures, en effet, ont toujours été grèles. Mais nous sommes convaincu que le succès en eût été meilleur, si nous avions opéré dans un pays où la lèpre ne s'estompe pas, et avec des cas très virulents. C'est la raison même qui nous fait publier nos résultats, tout incomplets qu'ils soient, pour que nos recherches soient reprises et utilisées par d'autres.

B. — CONDITIONS NÉCESSAIRES AU DÉVELOPPEMENT DU BACILLE  
DE HANSEN.

1<sup>o</sup> *Température.* — Nous avons obtenu des cultures à 37°, et aussi à 39°. Au début, en raisonnant par analogie, nous pensions que la température de 39° était indispensable; en réalité il n'en est rien: nous avons même l'impression que la végétation s'opère mieux à une température moins élevée.

2<sup>o</sup> *Milieux de cultures.* — a) *Mauvais milieux.* — Les milieux de cultures ordinaires, même après ensemencement abondant, sont toujours restés stériles. Les bouillons, les géloses, les gélatines, glycérinés ou non, de sucrage, d'alcalinisation, d'acidité, de salaison variables, ont toujours donné un même résultat négatif. Des cultures, faites en pipette dans du bouillon, suivant le procédé utilisé pour le streptocoque, ont été pareillement négatives.

Les milieux qui conviennent au développement du bacille de Koch, germe voisin d'apparence et dont la culture première fut difficile, ne réussissent point. La pomme de terre glycérinée, la pomme de terre avec sérosité pleurétique humaine, la pomme de terre enduite d'œuf n'ont jamais fourni la moindre colonie. Aucun tube n'a été infecté. Nous avons essayé des cultures en surface ou en profondeur, dans du bouillon de pommes de terre, mais en vain. Une des raisons de ce résultat négatif nous ayant paru être l'excessive acidité du milieu, nous avons alcalinisé nos pommes de terre ou les milieux qui en dérivaient, sans obtenir de succès.

Nous avons alors utilisé des milieux humanisés. Nous avons eu recours presque exclusivement aux milieux solides, gélosés, sur lesquels il était plus facile de suivre le développement des cultures.

La gélose ordinaire ne nous a jamais fourni trace de cultures. Sur les milieux suivants, au contraire, nous avons à plusieurs reprises obtenu quelques colonies grèles :

1<sup>er</sup> milieu : Eau, 1,000 grammes; Peptone Chapotot, 20 gr.; Glucose, 8 grammes; Glycérine, 20 grammes; Agar, 24 gr. Après filtration et mise en tubes, nous ajoutons à la gélose tiède et non coagulée 1 partie de sérum pleurétique humain pour 4 parties d'agar.

2<sup>e</sup> milieu : Eau, 1,000 grammes; Sel marin, 10 grammes; Glucose, 8 grammes; Peptone, 16 grammes; Agar, 16 grammes. Ajouter à 2 parties de cette gélose 1 partie de sérum pleurétique;

3<sup>e</sup> milieu : Eau de mer, 1,000 grammes; Glycérine, 40 grammes; Glucose, 4 grammes; Peptone, 20 grammes; Agar, 20 grammes. Ajouter à cette gélose, pour 2 parties, 1 partie de sérum pleurétique.

Les colonies furent toujours grèles, mais dans les mêmes milieux dépourvus de sérum pleurétique, la végétation ne se fit pas. D'ailleurs tous ces milieux avaient un grave défaut : à cause de la peptone, qui remplaçait la viande, leur réaction était nettement acide, et nous avons reconnu plus tard la supériorité des milieux neutres et même légèrement alcalins.

Un peu de suc lépreux, placé en ballon d'Erlenmeyer, dans le milieu liquide suivant : (Eau, 1,000 grammes; Sel,

8 grammes ; Peptone, 20 grammes ; Glucose, 6 grammes ; ajouter à 2 parties 1 partie de sérum pleurétique) donne naissance, au bout de 10 jours, à un certain nombre de grumeaux, disséminés dans le liquide et qui augmentent lentement de nombre et de volume pendant 15 jours, puis cessent de se développer. L'examen confirme l'existence manifeste de la culture, qu'on resème inutilement dans le même liquide ou divers milieux. D'ailleurs, sur six ballons ensemencés, nous n'eûmes qu'une seule fois ce succès de culture.

Les produits humains sont extrêmement utiles pour obtenir des cultures, mais non indispensables. Parmi les divers auteurs, qui ont tenté de cultiver le bacille de la lépre, MM. Bezançon et Leredde nous paraissent être de ceux qui ont obtenu un résultat partiel. Ayant ensemencé de nombreux tubes de gélose au sang de lapin, ils ont obtenu une fois quelques colonies, qu'ils ne purent repiquer. Le fait est d'autant plus intéressant que le sang de lépreux nous a paru empêcher le développement des bacilles, quand notre matériel de culture en était souillé.

Les milieux qui nous ont donné nos plus beaux résultats, comme nombre et volume des colonies et comme fréquence de développement sont les gélose-œuf. Nous sommes arrivés à y faire pousser des bacilles huit fois sur dix. Voici la formule que nous avons adoptée. Faire un bouillon avec 500 grammes de viande de veau dans 750 grammes d'eau de mer et 250 grammes d'eau distillée. Alcaliniser franchement, ajouter 40 grammes de glycérine, 8 grammes de glucose, 10 grammes de peptone, 20 grammes d'agar. Mettre dans l'agar refroidi 1 partie de jaune d'œuf pour 4 parties de gélose par tube.

Dans ces milieux, la culture commence vers le cinquième jour et s'accroît lentement, sous l'aspect d'une colonie blanchâtre partant du point d'ensemencement. L'accroissement se fait pendant 15 à 20 jours, puis s'arrête. Resemée sur même milieu, de façon large ou discrète, elle n'a jamais donné de nouvelles colonies.

Le développement des bacilles s'arrêtant environ vers le 25<sup>e</sup> jour, alors que les bacilles ont digéré toutes les cellules du léprôme importées de l'organisme humain, nous avons tenté de fournir à notre milieu des cellules vivantes. Nous avons

étalé sur gélose-œuf du sperme de taureau, dont la masse grumeleuse n'avait pu être incorporée à un milieu solide gélosé; nous ayons opéré de même en utilisant l'exsudat développé dans la plèvre d'un lapin, auquel nous injections quatre jours avant du gluten-caséine. Ces milieux ne nous ont pas donné de résultats supérieurs à ceux obtenus avec la gélose-œuf. Nous n'avons eu que des colonies grêles et parfois pas de cultures. Mais ces méthodes mériteraient d'être reprises : car les lésions lépreuses, d'où nous partions pour ces ensemencements, n'offraient plus que des bactilles peu vivants et granuleux, comme nous le montraient les frottis, faits au moment même des ensemencements.

Il est d'ailleurs un milieu naturel sur lequel nous avons obtenu des cultures, de façon manifeste et les plus belles que nous ayons eues. C'est l'œuf de poule vivant. Ici encore, le développement du bacille est inconstant. Pour l'obtenir, voici les précautions nécessaires. Une fois le suc lépreux recueilli, flamber le gros bout d'un œuf frais, y percer un petit trou avec un drille flamboyé : introduire avec précaution la pipette dans le jaune, qu'on aspire, pour s'assurer qu'on mettra bien la semence en plein œuf, puis souffler lentement, fermer ensuite l'œuf avec de la cire Golaz, et mettre à l'étuve l'œuf entouré d'ouate de toutes parts. Nous avons, sur 26 œufs, obtenu 2 fois des cultures, une fois à 37°, une fois à 39°. Sur ces 26 œufs, un seul fut infecté. Pourquoi la culture réussit-elle si rarement ? La plupart de nos œufs avaient reçu de mauvaises graines, soit non vivantes, soit souillées de traces de sang. Quelques œufs, quoique entourés d'ouate, s'étaient desséchés, racornis. Il est possible que, dans quelques cas, nous n'ayons pas trouvé dans l'œuf la culture, assez difficile à reconnaître, la colonie étant de petite taille et la technique malaisée ; mais dans la plupart des cas, il n'y a pas eu culture ; les microbes et les cellules introduites ne se retrouvent plus. En tout cas, voici comment on pourra trouver la colonie, développée aux dépens du suc lépreux. La coque de l'œuf enlevée, on rencontre une stalactite de jaune coagulé, reliant l'orifice d'entrée de la pipette à l'œuf rétracté. C'est dans le voisinage du plan passant par elle qu'on fendra, avec un bistouri stérile, l'œuf mis dans une boîte de Petri stérilisée. On verra alors, dans le jaune, presque

solide, et ressemblant à de la confiture d'abricots, un petit nodule, ferme, blanche jaunâtre, sur le fond jaune, de la grosseur d'un grain de chênevis : c'est une colonie de bacilles de Hansen. On a mis dans l'œuf des cellules lépromateuses et des microbes ; au bout de six semaines, de deux mois, on ne retrouve plus que des microbes. On a introduit des milliers de bactéries, il y en a des milliards. La culture est ici hors de doute, et personne, l'ayant vue ou reproduite, ne pourra croire à la simple persistance des germes inclus.

Les cultures faites *in vitro* à la surface du jaune d'œuf sont insignifiantes à cause du dessèchement du milieu.

## II

Ayant déterminé les conditions dans lesquelles on peut obtenir des cultures du bacille de Hansen, voyons les caractères macroscopiques et microscopiques qu'elles présentent :

Le bacille lépreux se développe, avec plus ou moins de constance, sur divers milieux, de préférence alcalins ou neutres, pourvus d'une certaine humidité. La végétation se produit à 37° et également à 39°. Des substances complexes, comme les sérums, l'œuf, lui sont nécessaires. Son développement dans nos milieux artificiels n'a jamais pu se faire qu'au contact de l'air. Cependant beaucoup d'air n'est pas nécessaire, puisque la culture se fait relativement bien, en plein œuf.

L'aspect des cultures n'est pas très particulier. Sur une strie d'ensemencement, c'est en rayonnant autour d'une parcelle lépromateuse que la colonie apparaît ; puis elle s'accroît en épaisseur. Le développement ne commence guère avant le 5<sup>e</sup> jour, et se poursuit net, mais faible, jusqu'au 15<sup>e</sup> jour environ. À partir du 20<sup>e</sup> au 23<sup>e</sup> jour, il s'arrête complètement. La colonie est blanc jaunâtre ; elle paraît blanchâtre sur la gélose-œuf, et jaunâtre sur le fond blanc des gélose-sérum. Elle est ferme, de consistance facile à émietter quand on l'étale sur lame.

À l'examen microscopique, les bacilles ont toujours les caractères orthochromatiques des bacilles de Hansen jeunes. Ils se colorent rapidement à froid par le Ziehl, gardent leur coloration après l'action de l'alcool nitrique à 4/10 ; ils prennent le Gram et ne se colorent pas par les bleus basiques.

Ils sont rouges, non granuleux, et ont tous les caractères objectifs des bacilles dans les lésions virulentes.

Leur développement se fait d'abord dans les cellules du léprome, qui disparaissent petit à petit, et finissent par être indistinctes ; mais le groupement globulaire du bacille montre bien que c'est dans la cellule macrophagique que se développent, au début, les colonies bacillaires, dont les petites boules confluent en masses plus volumineuses. Dans les cultures faites au sein de l'œuf, toute trace de cellules avait disparu, et les bacilles rayonnaient dans le jaune ; le grain de culture était sec et ferme.

Nous ferons remarquer que, sauf dans l'œuf, où la culture se poursuit longuement, le bacille, dont le développement commence le 3<sup>e</sup> jour, ne végète guère que 3 semaines. Peut-être la raison en est-elle qu'au bout de ce temps, la nourriture que lui fournissent les cellules humaines se trouve épuisée. Cela est vraisemblable, puisque le bacille, repiqué sur un tube neuf du même milieu, où il s'était développé, ne se développe plus, comme si l'absence de cellules humaines empêchait sa reproduction. Disons toutefois que nos deux belles cultures en œuf n'ont pas été repiquées par suite d'erreurs de technique ; les beaux résultats ayant été obtenus quand le malade avait des lépromes récents et n'ayant pas été reproduits ensuite. Or, ce sont les seules cultures où le bacille avait pu vivre après avoir digéré ses cellules et se développer nettement dans des milieux artificiels : en les resemant, on aurait donc eu quelque chance, après 45 jours, de l'adapter à une vie nouvelle, ce que nous n'avons jamais pu faire.

Tels sont nos résultats. Nous avons cultivé le bacille de Hansen, ou plutôt obtenu son développement hors de l'organisme humain, avec assez de constance. En suivant notre technique, il sera loisible d'arriver aux mêmes résultats que nous. Mais, pour en avoir de meilleurs, il sera nécessaire, et peut-être suffisant, de partir de lépres plus virulentes que celles de nos climats. Une fois qu'on aura des premières cultures plus vivaces, on peut espérer qu'elles s'adapteront à la vie artificielle, en des cultures ultérieures. Le progrès réalisé par nous, pour indéniable qu'il soit, n'est qu'un acheminement à la solution du problème.

## Explication de la Planche.

Figure 1. — Frottis d'un nodule lépreux jeune, coloration au Ziehl et au bleu polychrome.

Les bacilles sont nombreux, bien colorés, non granuleux.

Figure 2. — Frottis d'un léprome déjà ancien, en résorption. Mêmes colorations.

Les bacilles sont moins nombreux, se colorent mal, sont granuleux, beaucoup ont perdu leur propriété d'acido-résistance.

Figure 3. — Frottis d'une colonie (culture faite dans un œuf, ouvert au 45<sup>e</sup> jour).

Les bacilles existent seuls, les cellules lépreuses ont disparu. Les bacilles ont toutes les propriétés orthochromatiques et les caractères des bacilles vivaces.

# Sur la différenciation du « *Bacillus putrificus* » (Bienstock) et des bacilles anaérobies tryptobutyriques (Achalme)

PAR LE DR ANTOINE RODELLA

Chef du laboratoire de bactériologie de Lodi.

Au cours de mes études sur la flore anaérobie de l'intestin du nourrisson<sup>1</sup> et sur les microbes anaérobies trouvés dans un phlegmon gazeux<sup>2</sup>, dans la cavité buccale<sup>3</sup>, dans le lait et dans des fromages<sup>4</sup>, j'ai eu occasion de m'occuper *ex professo* d'un groupe des bacilles qui ont donné lieu en ces mêmes *Annales* à une controverse qui attend encore une solution. Tandis, en effet, que M. Achalme<sup>5</sup> attribue au *Bacillus putrificus* (Bienstock) un pouvoir fermentatif sur les hydrates de carbone, M. Tissier<sup>6</sup> le lui refuse, en expliquant la différence entre le résultat de ses recherches et celles d'Achalme par la raison que les cultures de ce *putrificus*, provenant des collections de l'Institut Pasteur, et ayant servi aux expériences de cet auteur, contenaient, à côté de cette dernière bactérie, quelques colonies d'une espèce analogue au *Bacillus bifermentans sporogenes*.

M. Tissier croit pouvoir ajouter que ses résultats concordent avec ceux qu'a obtenus M. Bienstock<sup>7</sup>.

L'action fermentative de ces microbes sur les sucres est une question très importante, au point de vue de la position systématique qui devrait être donnée au *Bacillus putrificus* (Bienstock). En effet, en se basant sur cette propriété biologique, deux savants déjà connus dans le monde scientifique pour leurs ouvrages sur les anaérobies, MM. Grassberger et Schattenfroh<sup>8</sup>, appelleraient le *Bacillus putrificus* du nom de « *Fäulnisserregende Buttersäurebacillus* », c'est-à-dire *Bacillus butyricus putrefaciens*.

1. *Zeitschrift für Hygiene*, t. XXXIX et XLI, 1902.

2. *Centralblatt für Bacteriologie*, I Abt., 1903, n° 3.

3. *Archiv für Hygiene*, t. LIII, 1903.

4. *Centralblatt für Bacteriologie*, II Abt., 1903-1904-1905.

5. Ces *Annales*, 1902.

6. Ces *Annales*, 1902 et 1903.

7. *Archiv für Hygiene*, t. XXXVI, 1899, et t. XXXIX, 1900.

8. *Archiv für Hygiene*, t. XXXVII, XLIII, XLVIII.

Achalme<sup>1</sup> aussi le rangeait au nombre des bacilles anaérobies tryptobutyriques, en s'appuyant non plus sur les phénomènes de putréfaction, mais sur la production d'une diastase tryptique. L'idée fondamentale toutefois n'avait pas varié, car dans les deux cas ce *Bacillus* restait comme un ferment butyrique anaérobie.

Quoiqu'ils aient été publiés il n'y a pas longtemps, nous croyons opportun, à cause de l'importance du sujet, de replacer sous les yeux des lecteurs les résultats des recherches d'Achalme sur la classification des bacilles anaérobies tryptobutyriques.

Le groupe étudié par M. Achalme est caractérisé ainsi qu'il suit :

« Bacilles anaérobies, se colorant par la méthode de Gram et mieux par celle de Claudio, produisant des spores, mais seulement en milieu alcalin, liquéfiant la gélatine, dissolvant, à l'aide d'une trypsine, l'albumine, la fibrine, la caséine : donnant naissance, par la fermentation des hydrates de carbone, à la formation d'acides volatils consistant en un mélange d'acide acétique et d'acide butyrique. »

Et plus haut : « Sécrétion de trypsine. Produits formés.— L'analyse chimique décèle la présence d'hydrogène sulfuré, d'acide carbonique, d'ammoniaques composées, de peptone en quantité souvent très faible, de leucine, de tyrosine et d'acides gras. Parmi ces derniers se rencontre un peu d'*acide butyrique* et d'*acide valérianique* que l'on peut toujours caractériser par la distillation fractionnée. L'eau bromée ne décèle pas la présence de phénol libre. Ce dernier, en effet, s'unit aux acides gras pour former des corps complexes, parmi lesquels se trouve toujours, en certaine abondance, l'*acide paroxyphénylpropionique*.

« Il est intéressant, en outre, de signaler que, sur fibrine, sur albumine, mais surtout dans les solutions concentrées de peptone, tous les bacilles du groupe donnent lieu à la formation, en quantité variable et jamais très abondante, d'un pigment noir, insoluble dans l'eau, l'alcool, les alcalis concentrés, soluble dans l'acide sulfurique et qui présente de grandes analogies avec la mélanine. »

Ce dernier point concernant la formation d'un pigment noir s'accorde parfaitement avec les recherches de Bienstock, et avec

1. Ces *Annales*, 1902.

celles que j'ai publiées autrefois moi-même et aussi avec les résultats de mes recherches actuelles. Je puis encore ajouter qu'un des milieux nutritifs les plus convenables pour la production d'un tel pigment, c'est le sérum de sang coagulé, coupé en petits cubes placés dans un tube à essai de Gruber avec 4 ou 5 fois leur volume d'eau, et stérilisé pendant un quart d'heure à 120°.

Dans ces cultures on remarque, outre la formation dudit pigment, celle de magnifiques cristaux de leucine et de tyrosine qui restent adhérents le long des parois des tubes, en leur donnant un aspect très beau et caractéristique.

Dans une prochaine monographie que je ferai paraître sur les anaérobies de la putréfaction, j'aurai occasion de présenter, en même temps que d'autres, la photographie de telles cultures.

Pour ce qui concerne la production des acides gras, il y aurait assez de concordance entre les résultats de Bienstock, d'Achalme et ceux de Tissier et Gasching.

Bienstock nous dit que dans un mélange de 100 grammes de fibrine avec 500 grammes de la solution de Cohn, le *Bacillus putrificus* dégage une odeur analogue à celle d'un mélange d'acides butyrique et valérianique. D'après cet auteur, comme produits de la putréfaction due au *Bacillus putrificus*, on a du mercaptan, des alcools, des phénols, des amines, des peptones, de la leucine, de la tyrosine, des acides lactique, succinique, butyrique, valérianique, paroxyphénylpropionique.

Tissier et Gasching écrivent :

« Le *Bacillus putrificus* ne touche pas plus au lactose, mais il disloque rapidement la molécule de caséine en donnant les mêmes produits qu'avec la viande. Il précipite d'abord la caséine, probablement par le fait d'une présure, puis la fait disparaître en donnant des caséases, des amines, de la leucine, de la tyrosine, des acides butyrique, acétique, valérianique, etc., en dégagent une odeur très fétide rappelant celle du fromage de Münster. »

En revenant à la classification de M. Achalme, il dit, pages 652 et suivantes :

« Alimentation hydrocarbonée. — Produits de fermentation. Sauf quelques insignifiantes différences de proportion, les produits de fermentation se sont montrés les mêmes, quelque soient l'hydrate de carbone et le microbe étudiés... »

« Après addition d'acide oxalique, la distillation met en évidence une proportion notable d'acides volatils, dont on peut facilement augmenter la quantité en ajoutant de la craie au milieu de culture. Le dosage en devient alors plus facile. La méthode de distillation fractionnée de M. Duclaux montre que *l'on n'a pas affaire à un seul acide, mais bien à un mélange*. Les chiffres obtenus dans un grand nombre de distillations ne varient que de quelques dixièmes, ce qui indique que le mélange d'acide se fait à peu près constamment dans la même proportion.

« Il s'agit donc d'un mélange *d'acides acétique et butyrique* dans la proportion moyenne de 5 parties d'acide acétique pour 3 parties d'acide butyrique. L'acidité fixe est toujours peu considérable et semble due à de faibles quantités d'acides lactique et succinique. »

Lehmann et Neumann<sup>1</sup> ne croient pas que les caractères donnés par Achalme, pour la différenciation de son groupe de bacilles, puissent être acceptés avec beaucoup d'avantage.

Grassberger et Schattenfroh<sup>2</sup> se servirent, surtout pour leur étude biochimique sur les anaérobies butyriques, de l'analyse des cultures dans le lait des dits microorganismes. Des travaux de ces deux auteurs, je crois opportun de rappeler seulement ici qu'ils se bornaient à l'étude des acides gras volatils et à la détermination des sels de baryum de ces acides.

Puisque le lait est un milieu naturel de composition définie et constante, il me parut utile de suivre moi-même la voie tracée par Grassberger et Schattenfroh, en étudiant les cultures dans le lait du *Bacillus putrificus*, comme cela a été fait par ces auteurs pour les ferment butyriques anaérobies. Ce plan d'étude éliminait les difficultés de l'anaérobiose, parce que l'on sait que le groupe des bacilles en question se développe très bien dans le lait entier stérilisé, la matière grasse formant une couche superficielle épaisse, suffisant à mettre les anaérobies à l'abri de l'oxygène de l'air.

Nous nous sommes servis de récipients coniques de 3 ou 4 litres, à col fort étroit et à base très large.

Avant d'entreprendre l'analyse des cultures, nous avons tou-

1. *Atlas und Grundriss der Bakteriologie*, 1904, page 371.

2. *Loc. cit.*

jours contrôlé leur pureté. Puis la culture était filtrée et l'on ajoutait, pour chaque litre de filtrat, 40 c. c. d'acide phosphorique dans la proportion de 1 d'acide pour 3 d'eau.

Suivant le conseil de Grassberger et Schattenfroh, on servit d'acide phosphorique au lieu d'acide sulfurique, pour éviter la mise en liberté d'acide chlorhydrique.

Je laissais reposer le liquide pendant la nuit, je faisais ensuite la distillation à la vapeur d'eau en distillant une quantité égale à celle qui se trouvait dans les matras.

Le produit de la distillation pouvant contenir de l'alcool et des acides volatils était alcalinisé avec une solution saturée de baryte caustique; l'excès de baryte était précipité par l'acide carbonique à l'état de carbonate de baryum. On distillait une deuxième fois. Les premiers 200 c. c. furent recueillis à part et la distillation fut poursuivie jusqu'à ce qu'il ne restât dans le matras que 200 à 400 c. c.

Ceux-ci furent filtrés et le filtrat évaporé au bain-marie jusqu'à commencement de cristallisation; le résidu sec était formé des sels de baryum des acides volatils.

Une partie des sels barytiques servit à l'analyse, une autre partie fut transformée en sels d'argent.

Dans le premier cas, on détermina le baryum à l'état de sulfate ( $BaSO_4$ ), dans le second cas l'argent fut déterminé comme argent métallique.

Dans cette seconde recherche, j'eus pour guide le tableau suivant que je trouvai dans le bel ouvrage de Orla Jensen<sup>4</sup>

	100 parties d'eau dissolvent à 20°.	0/0 d'argent
Acétate d'argent .....	1.037	64,67
Propionate .....	0,836	59,67
Butyrate .....	0,485	53,38
Valérianate .....	0,183	51,67
Capronate .....	0,078	48,43
Caprylate .....	insoluble	43,03

A l'aide de ce tableau j'entrepris la précipitation fractionnée avec le nitrate d'argent en solution normale. Je fis, par chaque culture, environ six précipitations fractionnées des sels barytiques avec le nitrate d'argent. Les sels barytiques des acides volatils en solution suffisamment concentrée étaient partiellement

4. *Landwirtschaftliches Jahrbuch der Schweiz*, 1904.

précipités avec le nitrate d'argent, le précipité était recueilli sur filtre, et le liquide filtré précipité à nouveau et cela six fois consécutives.

Les sels d'argent restés sur les filtres étaient séchés dans le vide, sur l'acide sulfurique, jusqu'à ce que leur poids restât constant. Voici, à titre d'exemple, la teneur en argent des divers précipités.

#### I. — CULTURE DE BACILLUS PUTRIFICUS ISOLÉ DU LAIT.

1 <sup>er</sup> précipité	Ag.	48,27
2 <sup>e</sup> —		48,06
3 <sup>e</sup> —		48,53
4 <sup>e</sup> —		48,33
5 <sup>e</sup> —		48,00
6 <sup>e</sup> —		48,50
7 <sup>e</sup> —		49,00

Résultat : acide capronique.

#### II. — CULTURE DE BACILLUS PUTRIFICUS ISOLÉ DU LAIT.

1 <sup>er</sup> précipité	Ag.	50,90
2 <sup>e</sup> —		51,45
3 <sup>e</sup> —		51,40
4 <sup>e</sup> —		51,50
5 <sup>e</sup> —		51,49
6 <sup>e</sup> —		51,20
7 <sup>e</sup> —		52,50
8 <sup>e</sup> —		50,00
9 <sup>e</sup> —		48,40

Résultat : acide valérianique.

#### III. — CULTURE ISOLÉE D'UN PHLEGMON GAZEUX.

1 <sup>er</sup> précipité	Ag.	54,05
2 <sup>e</sup> —		54,96
3 <sup>e</sup> —		55,40
4 <sup>e</sup> —		55,17
5 <sup>e</sup> —		54,00

Résultat : acide butyrique.

#### IV. — CULTURE ISOLÉE DU LAIT

1 <sup>er</sup> précipité	Ag.	48,86
2 <sup>e</sup> —		48,56
3 <sup>e</sup> —		48,66
4 <sup>e</sup> —		48,69
5 <sup>e</sup> —		48,79
6 <sup>e</sup> —		50,00

Résultat : acide capronique.

V. CULTURE ISOLÉE DU LAIT. — 1<sup>er</sup> précipité. Ag. 51,73. —

2<sup>e</sup> pr. Ag. 51,84. — 3<sup>e</sup> pr. Ag. 50,86. — 4<sup>e</sup> pr. 50,33. — 5<sup>e</sup> pr. 48,82. — 6<sup>e</sup> pr. 48,43.

Résultat : un mélange d'acides valérianique et capronique.

Outre l'analyse des acides gras volatils, je dosai aussi le lactose dans les cultures examinées. La méthode que j'ai suivie pour cette recherche est celle qui, dans un récent article paru dans l'*Industrie laitière* (10 septembre 1905. n° 37), a été considérée la meilleure. C'est la méthode de Fehling, modifiée d'après Soxhlet ou Allihn. Les albumines doivent être préalablement précipitées par l'accétate de plomb, dont l'excès est éliminé par le carbonate de soude.

De nos cultures dans le lait, quelques-unes étaient à peine acides, d'autres au contraire l'étaient nettement ; fait noté, du reste, par Bienstock.

Avec la méthode ci-dessus, je pus me convaincre que le *Bacillus putrificus* avait détruit peu de lactose.

Je ne crois pas nécessaire de rapporter ici le protocole de l'analyse de toutes mes cultures, je renvoie le lecteur qui y trouverait intérêt à ma monographie sur la putréfaction et sur les microbes anaérobies de la putréfaction. Je rapporterai seulement ici les conclusions auxquelles m'ont conduit mes recherches.

I. La seule fermentation des hydrates de carbone ne peut servir à différencier les 9 bacilles étudiés par Achalme, ni les autres microbes anaérobies ayant la propriété de faire fermenter de la même manière les substances *albuminoïdes*.

II. Pour la classification des dits anaérobies, il faut tenir compte de la fermentation des hydrates de carbone, et aussi de celle des substances protéiques : et cette dernière donne souvent des indications meilleures que la première.

III. Puisque, dans presque toutes nos cultures dans le lait, le lactose, même après 4 semaines, était demeuré inaltéré, nous devons en conclure que les acides gras qui s'étaient formés dérivaient de la fermentation de la caséine, qui était à peu près détruite.

IV. Quelques bacilles donnèrent, avec la caséine, exclusivement de l'acide butyrique ; d'autres, de l'acide valérianique ; d'autres, de l'acide capronique. Nous devons admettre que, de même que les hydrates de carbone fournissent des acides lac-

tique, acétique, butyrique, de même les albumines, sous l'action des bacilles anaérobies, subissent une *fermentation spécifique*, butyrique, valérianique, capronique.

V. Le fait que les 9 bacilles d'Achalme et ceux étudiés par d'autres auteurs donnent toujours lieu à un mélange d'acides gras volatils, et jamais à un acide volatil pur, a été jusqu'ici mal interprété.

Quand les substances protéiques fermentent seules, nous avons un seul acide volatil. Le mélange de deux acides volatils indique déjà une fermentation mixte d'albuminoïdes et d'hydrates de carbone.

Nous sommes conduit à cette conclusion par le fait que les cultures dans le lait n'ont donné qu'un seul acide volatil chaque fois que le lactose est resté intact.

---

# NOTE SUR UNE ÉPIDÉMIE CHOLÉRIQUE

localisée, d'origine manifestement hydrique

PAR LE DR BRAU, DE L'INSTITUT PASTEUR DE SAIGON

Le croiseur de la marine française *D'Assas*, en rade de Saïgon, ayant présenté, coup sur coup, dans son équipage, plusieurs cas cholériformes, très rapprochés, à partir du 15 juin 1905, les autorités du bord se sont émues et ont bien voulu me demander mon avis en la circonstance. Il s'agissait de cas de choléra bien typiques, un vibron classique ayant été isolé chaque fois des selles riziformes. Des échantillons de ces vibrions ont été adressés à M. le Dr Denier, dans le laboratoire de M. Roux, à l'Institut Pasteur de Paris, sous la rubrique : vibrions : G, I, J, K, de Cochinchine, année 1905. La plupart des hommes atteints n'avaient pas quitté le bord depuis longtemps. Les cas G, I, J en particulier avaient été surpris par des symptômes foudroyants, cholériformes, étant encore au régime, convalescents de diarrhée ou de dysenterie. L'hypothèse d'une contamination à terre paraissait donc devoir être écartée. Nous avons été d'avis, M. le Dr Roux, médecin du bord, et moi-même, de consigner les caisses à eau du croiseur jusqu'à nouvel ordre et d'alimenter les hommes à l'aide des récipients du même genre existant à bord du cuirassé de station *Le Redoutable*.

J'ai procédé ensuite à la recherche des vibrions dans chacun des récipients qui constituent le système aquifère du bord.

Le schéma ci-dessous peut en donner une idée. On remarquera la disposition défectueuse des caisses à eau principales, placées sur les faces latérales arrondies du pont cuirassé, de façon à constituer des angles dièdres. On remarquera aussi la singulière conception qui a amené à placer des filtres à charbon, assez rudimentaires d'ailleurs, sur le trajet des conduites à eau distillée. Nous avons opéré successivement pour les divers récipients (réservoir à la sortie du filtre, caisse à eau proprement dite et charnier, muni d'un robinet, où viennent puiser les hommes, sur le pont), à l'aide de la méthode préconisée par Sanarelli<sup>1</sup>.

1. Les vibrions des eaux et l'étiologie du choléra, *Annales de l'Institut Pasteur*, tome VII, 1893, p. 695.

Nous avons donc ajouté aux éléments du milieu de Metchnikoff :

Gélatine .....	2 grammes
Peptone sèche .....	1 gramme
Chlorure sodique.....	1 " —
Nitrate potassique.....	0 <sup>o</sup> , 10
Eau .....	Q.S.

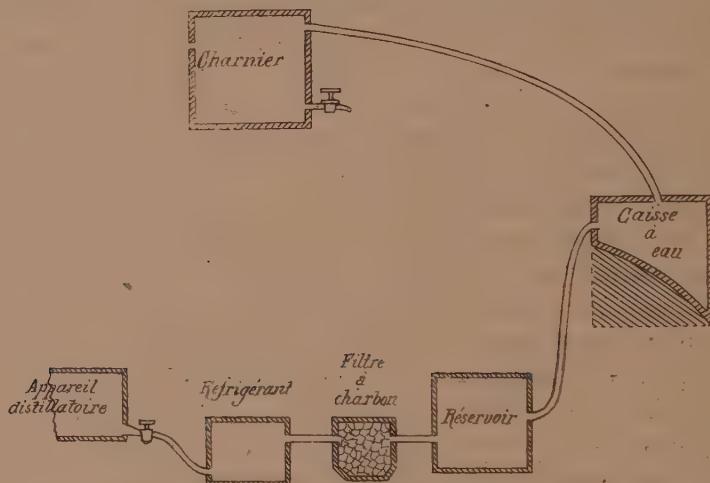
introduits stérilisés à l'avance, dans un ballon stérile, environ 200 grammes de chacune des eaux. Nous avons ensuite transporté nous-même ces cultures dans l'étuve à 37°. Nous nous sommes un peu écarté, à partir de cet instant, de la méthode usuelle.

Depuis de nombreux mois que nous étudions, en collaboration avec M. le Dr Denier, les caractères, la virulence et la toxicité du vibron de Cochinchine, nous avons pu remarquer que sa pullulation en milieu de Metchnikoff est beaucoup plus rapide que dans les climats tempérés d'Europe. Il en est de même malheureusement de certains germes saprophytes, *subtilis*, *proteus*, *mesentericus*, etc., qui pullulent dans nos eaux tropicales et étouffent très promptement, sous leur prolifération encore plus intensive, celle du microbe de Koch. Nous avons pris l'habitude de ne pas attendre la formation du voile. Au bout de trois heures environ, alors qu'une légère opacité ternit à peine le liquide ensemencé, il est, selon nous, dans nos climats, grandement temps de tremper à la surface une césse de platine stérilisée et de la promener légèrement ensuite, à la surface de plusieurs tubes de gélose inclinée. Nous avons obtenu, en procédant ainsi, de très bons résultats et il est bien rare, à l'heure qu'il est, de ne pas isoler facilement le vibron cholérique dans chaque cas clinique bien net. On peut en voir un exemple à l'occasion de l'épidémie du *d'Assas*, où chaque malade nous a fourni son bacille virgule.

Dans le cas particulier de l'examen des eaux, nous avons voulu procéder encore plus strictement, si possible. Nous nous sommes astreints à rester dans notre laboratoire toute la journée, afin de pouvoir prélever toutes les heures, à partir de 11 heures du matin, heure de l'ensemencement de la culture à bord du *d'Assas*, une trace liquide qui serait reportée ensuite, à chaque fois sur cinq tubes de gélose inclinée. Les deux premières heures, nos ensemencements sont restés stériles. C'est seulement au bout de la troisième heure que nous avons vu apparaître, sur 3 de nos tubes de gélose, des colonies

claires, promptement envahissantes, en coulée de verre, liquide que l'examen microscopique d'abord et plus tard les diverses cultures ont révélé comme un vibron très typique, court et trapu, en tout point analogue aux vibrons pathogènes isolés de l'ensemencement des selles des malades du *d'Assas* qui, eux-mêmes, ne différaient en rien de toutes les autres espèces isolées jusqu'ici en Cochinchine, tant par M. le Dr Calmette que par nous.

Dans un des tubes, une autre espèce microbienne des plus envahissantes, le *B. lactis aerogenes*, apparaissait déjà. Mais,



dans 2 autres se trouvaient des cultures absolument pures de ce vibron suspect.

Dans les ensemencements des heures suivantes, jusqu'à 6 heures du soir, la prolifération des saprophytes étouffait presque entièrement toute trace de vibron. Nous avons donc agi en procédant comme nous l'avons fait.

L'eau des trois réservoirs examinés s'est montré identiquement souillée par le même vibron, en tout point analogue aux 27 espèces que nous avons isolées des selles des malades cochinchinois. Un échantillon de chaque vibron provenant du réservoir de la caisse à eau proprement dite et du charnier a été adressé à M. le Dr Denier, à l'Institut Pasteur. On peut donc

1. Il liquéfie en clou la gélatine, donne un voile en eau peptonée, coagule le lait, toutes réactions de culture caractéristiques du vibron de Cochinchine.

établir en fait que tout le système aquifère du croiseur *D'Assas* était envahi par le vibrion de Koch.

M. le Dr Montel ayant récemment rénové l'idée, déjà ancienne, de la propagation du choléra par les mouches, nous avons cherché si les mouches du bord étaient souillées de vibrion de Koch. Nous avons capturé quelques échantillons des mouches bourdonnant à l'entour des plats dans les batteries, la plupart appartenant au genre *Lucilia*. Nous avons examiné, après coloration, sur des lames, des frottis de déjections et de tubes digestifs. Nous avons aussiensemencé des excréments et les corps mêmes de ces mouches. Dans aucune de ces opérations nous n'avons réussi à retrouver une espèce vibrionienne quelconque.

Du reste, ce qui semble prouver encore plus l'évidence de la contagion hydrique, dans ce cas particulier, c'est que l'épidémie a brusquement cessé dès que l'équipage s'est mis à consommer une autre eau que celle du bord, ne renfermant pas de vibrion suspect à l'analyse bactériologique (eau du *Redoutable*). On se sert maintenant de nouveau à bord des anciennes caisses, un peu modifiées. Tout le système aquifère a été stérilisé à l'aide de l'appareil Clayton. La première eau qu'il a contenue après a été soumise à mon examen. Je n'y ai pas rencontré de germe suspect. L'état sanitaire du bateau est satisfaisant depuis lors.

On ne peut, selon moi, attribuer la pollution de cette eau qu'à l'emploi, à bord, de matelots ou d'ouvriers indigènes. J'ai vu, moi-même, des coolies mettre en contact avec le robinet du charnier des récipients très malpropres. La mauvaise disposition des caisses, qui oblige à y faire entrer un homme européen ou indigène quand il s'agit de les nettoyer ou de les explorer, peut être aussi invoquée comme cause de contamination. J'opinerais assez à croire que le facteur principal de la contagion est un Asiatique, car M. le commandant du bateau m'a appris qu'un cas cholériforme foudroyant s'était produit chez un Annamite, occupé à travailler dans la cale du bord, très peu de temps avant l'éclosion de l'épidémie.

# Action des microbes vivants SUR LA SOLUTION DE BLEU AZUR DANS L'ALCOOL MÉTHYLIQUE

PAR M. F. MARINO

Lorsqu'on ajoute à une solution de bleu de méthylène une petite quantité de carbonate de soude et qu'on abandonne le mélange à lui-même pendant un certain temps, la solution, d'abord franchement bleue, prend une teinte pourpre visible à la surface. Cet aspect est dû à la formation d'une nouvelle substance résultant de l'action du carbonate de soude sur le bleu de méthylène. La réaction se fait beaucoup plus vite si on élève la température. Cette matière colorante nouvelle, mise en présence d'une solution faible d'éosine, s'unite à la couleur acide et donne un bain colorant où l'éosine est masquée et qui est employé notamment pour la coloration des hématozoaires. Ces faits sont bien connus depuis les travaux de Leishman et autres. Nous-mêmes avons indiqué dans ces *Annales* la préparation d'un bain colorant qui nous a paru avantageux dans bien des cas.

Faisons donc dissoudre 1 gramme de bleu de méthylène dans 15 grammes d'eau et ajoutons 0<sup>gr</sup>.30 de carbonate de soude. La solution est laissée pendant 24 heures entre 60° et 80°; on y verse alors 0<sup>gr</sup>.50 d'éosine dissoute dans 10 grammes d'eau. Le tout est abandonné à lui-même pendant 24 heures ou même plus longtemps; dans certaines expériences nous avons laissé le bleu alcalin et l'éosine en contact pendant 10 jours. On recueille sur un filtre le précipité formé, on le sèche et on le pèse. Dans les conditions que nous venons de dire, le poids du précipité a été trouvé égal à 0<sup>gr</sup>.9. Mais on peut, en gardant constantes les quantités de bleu et de carbonate de soude, augmenter la dose d'éosine et employer, par exemple, 1 gr., 4 gr., 8 gr., 16 gr., 32 grammes d'éosine, en ajoutant assez d'eau pour maintenir l'éosine dissoute. Les poids des précipités recueillis sont : 4<sup>gr</sup>.3; 0<sup>gr</sup>.86; 0<sup>gr</sup>.25; 0<sup>gr</sup>.20; 0<sup>gr</sup>.00; c'est-à-dire que le poids du précipité est maximum lorsque le mélange renferme

1 de bleu et 1 d'éosine, puis il va en diminuant au fur et à mesure que l'on augmente la proportion d'éosine.

Le même fait s'observe si la quantité d'éosine reste fixe et et que celle de bleu augmente progressivement<sup>1</sup>.

Le précipité est donc soluble soit dans un excès de couleur acide, soit dans un excès de couleur basique.

Ces divers précipités, dissous dans l'alcool méthylique, et traités par l'éosine, d'après notre méthode, ne teignent pas également bien le noyau des cellules. Celui qui est obtenu au moyen de 1 gramme d'éosine et de 2 grammes de bleu colore le mieux. Au-dessus et au-dessous de ces proportions, il se rassemble des précipités dont l'action colorante est plus faible.

Ainsi la couleur qui résulte du mélange de 1 gramme d'éosine et de 2 grammes de bleu de méthylène teint fort bien les noyaux et les membranes ondulantes des trypanosomes ; celle provenant de 1 gramme d'éosine et de 8 grammes de bleu ne colore plus le noyau en rouge rubis, le ton bleu domine partout. Il en est de même, que le précipité soit dissous dans l'eau distillée, dans l'eau ordinaire, l'eau physiologique, l'alcool absolu, l'alcool méthylique. Des faits analogues s'observent si on augmente les proportions d'éosine en laissant constantes celles du bleu de méthylène.

4. Il nous semble que l'on peut comparer ce qui se passe entre le bleu et l'éosine dans l'expérience que nous venons de citer, et ce qui se produit lorsqu'on ajoute à une même quantité de toxine des doses de plus en plus grandes d'antitoxine. La première portion d'antitoxine ajoutée a plus d'action que la seconde, et celle-ci plus que la troisième. Ehrlich, qui a découvert ce fait, l'explique en admettant que la toxine se compose de plusieurs substances ayant des affinités différentes pour l'antitoxine. Arrhenius et Madsen ne croient pas à cette complexité de la toxine et, pour eux, toxine et antitoxine se combinent à la façon d'une base et d'un acide faibles. Il se fait un état d'équilibre entre les corps réagissants et les produits de la réaction.

Les réactions sont limitées et obéissent à la loi de Gudberg et Waage. Il y a donc toujours, dans le mélange, de la toxine et de l'antitoxine libres. Nous croyons que les réactions entre une même quantité de bleu et des doses croissantes d'éosine sont analogues à celles qui ont lieu entre la toxine diphtérique et l'antitoxine. Pour mettre en évidence la toxine dans le mélange neutre toxine et antitoxine, Madsen le verse à la surface d'un tube de gélatine et maintient le tout 66 jours à la glacière.

La toxine diffusant plus vite que l'antitoxine peut être mise en évidence dans les portions inférieures de la gélatine. De même, l'éosine semble ne plus exister dans le précipité obtenu par le mélange de 2 grammes de bleu et de 1 gramme d'éosine, puisqu'une goutte de la solution aqueuse ne donne sur le papier buvard qu'une tache bleue sans trace de rose. Mais il suffit de faire la solution dans l'alcool méthylique pour obtenir une zone rose autour de la tache bleue centrale. L'éosine est ainsi mise en évidence comme la toxine dans l'expérience de Madsen.

Faut-il conclure de ce qui précède que l'union du bleu et de l'éosine se fait en proportions définies et que celles-ci sont réalisées lorsque la coloration du noyau se fait le mieux ? Nous ne le pensons pas ; car il suffit de faire tomber sur du papier buvard une goutte de la solution du précipité (Eosine 4, Bleu 2) dans l'alcool méthylique pour voir se former deux zones colorées, une centrale bleue et une périphérique rose. L'éosine n'est donc pas engagée dans une combinaison stable et elle diffuse plus rapidement que le bleu. Si on fait l'essai au papier buvard avec une solution aqueuse du même bleu, on n'obtient qu'une tache bleue sans trace de rose, comme si l'éosiné n'existeit plus.

Cette solution de bleu éosiné dans l'alcool méthylique, mise en présence de certaines cultures microbiennes en bouillon, se dissocie d'une façon intéressante.

A la surface d'une culture de bactéridie charbonneuse développée en bouillon et contenue dans un tube à essai, versons notre solution colorante de façon qu'elle ne se mélange pas au liquide, faisons de même avec un tube de bouillon nonensemencé, puis abandonnons les deux tubes à la température du laboratoire. Déjà après cinq minutes, la couche colorée en contact avec la culture a changé d'aspect. On perçoit, en effet, au-dessus du liquide de culture une zone rose qui va en augmentant de plus en plus, après quelques heures elle forme un anneau rose surmonté d'une couche bleue. Dans le tube de bouillon, aucun changement ne se produit dans le même temps.

L'explication de ce phénomène est facile. Le bleu étant réduit, au contact de la culture microbienne, en composé incolore, la teinte de l'éosine devient apparente. Cette réduction est accomplie par les microbes vivants : il suffit de chauffer la culture de bactéridie au-dessus de 70° pour que la réduction ne se fasse pas et que le rose ne se montre pas. Les substances organiques du bouillon, de même que le glucose, le lactose et le saccharose, sont sans effet sur la couleur dans les conditions que je viens de dire. Nous avons constaté cette réaction avec un grand nombre de cultures, elle est d'autant plus marquée que la culture est en pleine activité et plus abondante. Il va de soi qu'elle ne s'observe pas avec les microbes qui croissent avec une extrême lenteur, le bacille tuberculeux par exemple. Pour

perevoir quelque chose, il faudrait attendre trop longtemps; la diffusion aurait mélangé la matière colorante et la culture.

Cette réaction permet de distinguer les diverses races d'une bactérie qui ne poussent pas avec la même activité, et d'apprécier les qualités des différents milieux.

Versons notre solution colorante à la surface d'une culture en bouillon de *Bacillus anthracis* virulent, d'une culture de second vaccin et d'une culture de premier vaccin charbonneux en plein développement et de même âge. Moins de cinq minutes après le début de l'expérience, la zone rose est manifeste à la surface de la culture de charbon virulent, elle n'apparaît qu'après 10 à 15 minutes dans le tube de second vaccin et plus tardivement encore dans celui de premier vaccin. L'énergie de la réduction se marque par la dimension des anneaux roses plus «pais au-dessus de la culture virulente et réduits à un simple liseré sur la culture de premier vaccin.

La même différence s'observe entre les cultures virulentes du bacille du rouget des porcs et les cultures atténueées, entre les cultures d'un bacille morveux très actif et celles d'un bacille morveux peu virulent.

La rapidité de la réaction n'est pas fonction de la virulence des bactéries, car des streptocoques peu actifs produisent la teinte rose avant d'autres beaucoup plus meurtriers pour les animaux. La réduction du bleu et l'apparition de la zone est d'autant plus prompte que les microbes sont plus nombreux dans les cultures employées. L'expérience suivante le prouve : des cultures de premier et de second vaccin charbonneux sur des tubes de gélose inclinée sont raclées et les bacilles mis en suspension dans deux tubes de bouillon, de façon que l'émulsion du premier vaccin soit deux fois plus riche en corps microbiens que celle du second vaccin. On verse alors dans les deux tubes la même quantité de matière colorante, la zone rose se montre d'abord à la surface du premier vaccin où les bacilles sont les plus nombreux.

L'élévation de la température favorise beaucoup la réduction du bleu; trois tubes de culture de cocco-bacille de la peste sont placés l'un à 35°, l'autre à 25°, le troisième à 0°; lorsqu'ils ont pris la température des enceintes où ils sont placés, on verse dans chacun d'eux 1 c. c. de la solution colorante dans

l'alcool méthylique. Au bout de 1 à 2 minutes, la teinte rose est visible à la surface de la culture à 35°, elle se montre après 5 à 6 minutes dans la culture à 25° et n'apparaît pas du tout dans la culture maintenue à 0°.

Je me suis demandé si cette réaction ne pourrait pas servir à déceler la présence de microbes dans les liquides où l'examen microscopique n'en montre pas; par exemple, dans les sérosités contenant des microbes dits invisibles qui traversent les filtres arrêtant les bactéries ordinaires et ne troublent point les milieux où ils se développent. Une culture de péripneumonie en bouillon-sérum et restée 48 heures à l'étuve fut mise obligamment à ma disposition par M. Dujardin-Beaumetz; elle me donna une zone rose manifeste en 10 minutes. Mais ni la sérosité aphèteuse, ni celle contenant le virus de la maladie des chiens, non plus qu'un liquide tenant en suspension du virus syphilitique, n'ont donné de réduction appréciable dans des essais faits par M. Carré ou par moi-même. Il en a été de même avec des spirilles et des trypanosomes.

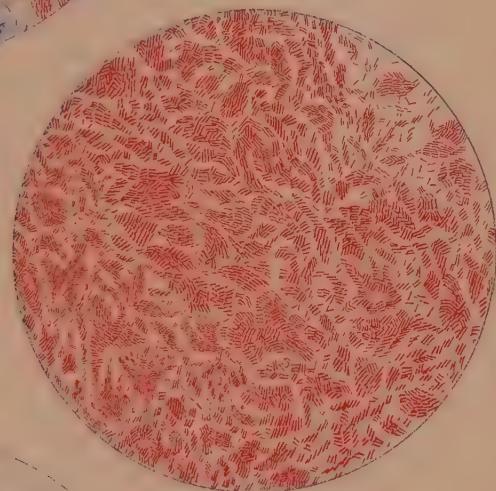
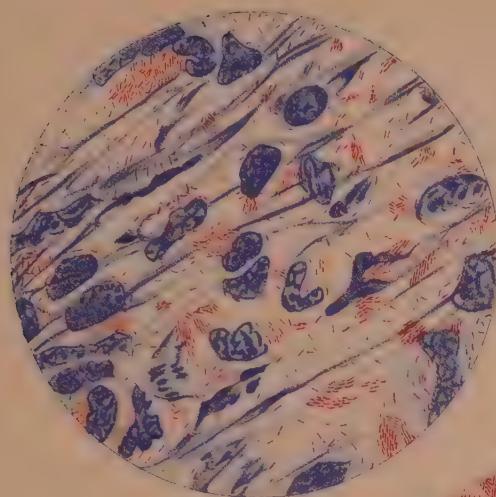


Fig. 3



## TABLE DES MATIÈRES

---

	Pages.
Recherches sur le sérum antirabique, par M. A. MARIE . . . . .	1
Culture de l'amibe de la dysenterie des pays chauds, par M. A. LESAGE . . . . .	9
Trypanosomiase des dromadaires de l'Afrique du Nord, par MM. les Dr <sup>s</sup> EDMOND et ETIENNE SERGENT . . . . .	17
Sur le diagnostic histologique de la rage, par les Dr <sup>s</sup> F. ABBA et A. BORMANS . . . . .	49
Peste endémique, bubons climatiques, lymphangite infec- tive de la Réunion et érysipèle de Rio, par le Dr THIROUX . . . . .	62
Recherches morphologiques et expérimentales sur Trypano- nosoma Paddæ, par le Dr THIROUX . . . . .	65
Contribution à l'étude des Hémolysines naturelles, par M. G. MIONI . . . . .	84
Répartition des microbes dans l'intestin du nourrisson, par M. HENRY TISSIER . . . . .	109
Sur la détermination quantitative du colibacille dans les eaux d'alimentation, par M. ALBERT GAUTIÉ . . . . .	124
Etudes épidémiologiques et prophylactiques du Paludisme en Algérie, en 1904, par MM. EDMOND et ETIENNE SERGENT	129
Les tumeurs de la souris, par M. HAALAND . . . . .	163
Propriétés bactériolytiques et anticytasiques du venin de Cobra, par le Dr F. Noc . . . . .	209
Sur un hématozoaire endoglobulaire nouveau d'un mam- mifère, par le Dr J.-J. VASSAL . . . . .	224
Sur la signification du « Bacillus coli » dans les eaux pota- bles, par le Dr H. VINCENT . . . . .	233
De la valeur thérapeutique de l'antitoxine dans le sérum antidiphétique, par L. CRUVEILHIER . . . . .	249
Etude sur un nouveau procédé de recherche de l'ammo- niaque et des sels ammoniacaux, applicable à la caracté- risation des eaux potables, par MM. A. TRILLAT et TURCHET . . . . .	259
Réaction de la tortue terrestre à quelques maladies infec- tieuses, par MM. REMLINGER et OSMAN NOURI . . . . .	266

	Pages.
Etude d'une variété d'infection intestinale chez le nourrisson, par M. H. TISSIER.....	273
Contrôle de la valeur des vaccins jennériens par la numération des éléments virulents, par M. C. GUÉRIN.....	317
Sur la nature des éléments cellulaires du colostrum et du lait chez la femme, par MM. V. WALICH et C. LEVADITI.....	321
Essai d'immunisation par la voie gastro-intestinale contre la toxine botulique, par le Dr A. TCHITCHKINE.....	335
Coloration des Protozoaires (Remarques sur la publication de M. F. Marino, portant le même titre), par M. G. GIEMSA.....	346
Au sujet de la coloration des protozoaires, réponse à M. Giemsa, par M. F. MARINO.....	354
Effets expérimentaux de la toxine dysentérique sur le système nerveux, par M. CH. DOPTER.....	353
Contribution à l'étude de la bactériologie de l'appendicite, par le Dr PERRONE.....	367
Les microbes dans l'industrie fromagère, par P. MAZÉ.....	378
Répartition des microbes dans l'intestin du nourrisson (Observation sur le travail de M. Tissier), par le Dr A. RODELLA.....	404
Les vaccinations antirabiques à l'Institut Pasteur en 1904, par J. VIALA.....	411
Sur quelques points relatifs à l'action pathogène de l'amibe dysentérique, par M. CH. DOPTER.....	417
Contribution à la bactériologie des gastro-entérites infectieuses, par M. H. POTTELIN.....	426
Sur une variété de tuberculose zooglique et ses rapports avec la pseudo-morve, par le Dr JEAN CAGNETTO.....	449
Etudes sur le bacille typhique et le bacille de la peste, par le Dr BESREDKA.....	477
Les microbes dans l'industrie fromagère, troisième partie : Les fermentations de la caseine, par P. MAZÉ.....	481
L'ammoniaque dans le lait, recherche et interprétation de sa présence, par MM. A. TRILLAT et SAUTON.....	494
Sur la division nucléaire de la levure pressée, par M. SWELLENGREBEL.....	503
Sur le mécanisme du phénomène de l'action fractionnée	

## TABLE DES MATIÈRES

823

	Pages.
des toxines (phénomène de Danysz) par le Dr C. LE-VADITI.....	516
Contribution à l'étude de l'épuration des eaux résiduaires des villes et des industries, par MM. A. CALMETTE, E. BOULANGER et E. ROLANTS.....	529
Des méthodes employées pour surveiller les eaux destinées à l'alimentation, et de l'interprétation à donner aux résultats obtenus, par M. F. DIENERT.....	541
Recherches morphologiques et expérimentales sur <i>Trypanosoma Duttoni</i> Thiroux, par le Dr THIROUX.....	564
Action des injections salines prophylactiques et thérapeutiques, sur les cobayes soumis à l'inoculation intraperitoneale de bacille typhique et de vibron cholérique, par M. LUBOMOUDROV.....	573
La recherche du bacille d'Eberth, son importance au point de vue de la prophylaxie de la fièvre typhoïde, par M. A. BRAUN.....	578
La déviation de l'alexine dans l'hémolyse, par le Dr FREDERICK GAY.....	563
Origine intestinale de la tuberculose pulmonaire, par MM. A. CALMETTE et G. GUÉRIN.....	601
De la genèse des lésions pulmonaires dans la tuberculose, par M. H. VALLÉE.....	619
Accidents paralytiques au cours du traitement antirabique, par le Dr P. REMLINGER.....	625
Sur la phagocytose « <i>in vitro</i> » de microbes pathogènes, par M. LÖHLEIN.....	647
La formation des granulations dans les cultures des vibrons, par le Dr GUIDO Q. RUATA.....	661
Etudes expérimentales sur la syphilis (quatrième mémoire), par EL. METCHNIKOFF ET EM. ROUX.....	673
Recherches sur la maladie expérimentale provoquée par l'inoculation des bacilles tuberculeux dégraissés, par le Dr CANTACUZÈNE.....	699
Unicité de la dourine, par MM. G. E. SCHNEIDER et BUFFARD	715
Sur la présence de l'aldéhyde formique dans les produits gazeux de la combustion, et sur les applications qui en découlent. Essais de désinfection, par M. A. TRILLAT..	718

Etude historique sur l'utilisation des feux et des fumées comme moyen de défense contre la peste, par M. A. TRILLAT . . . . .	734
Sensibilisatrice spécifique dans le sérum des animaux vaccinés et des malades, par M. CH. DOPTER . . . . .	753
Contribution à l'étude des sérum hémolytiques, recherches sur le mode d'union du sérum et des substances actives avec les globules rouges, par M. L. REMY . . . . .	765
Sur l'origine intestinale de l'anthracose pulmonaire, par MM. VANSTEENBERGHE et GRYSEZ . . . . .	787
Essais de culture du bacille lépreux, par M. EMILE-WEIL . . . . .	793
Sur la différenciation du « Bacillus putreficus » (Bienstock) et des bacilles anaérobies (Achalme), par le Dr ANTOINE RODELLA . . . . .	804
Note sur une épidémie cholérique localisée, d'origine manifestement hydrique, par le Dr BRAU . . . . .	812
Action des microbes vivants sur la solution de bleu azur dans l'alcool méthylique, par M. F. MARINO . . . . .	816

## TABLE ALPHABÉTIQUE PAR NOMS D'AUTEURS

---

	Pages.
ABBA (F.) et BORMANS (A.).	Sur le diagnostic histologique de la rage. 49
BESREDKA.....	Études sur le bacille typhique et le bacille de la peste. 477
BORMANS (A.).....	Voir ABBA. 49
BOULLANGER (E.).....	Voir CALMETTE. 529
BRAU .....	Note sur une épidémie cholérique localisée, d'origine manifestement hydrique. 844
BRAUN (A.).....	La recherche du bacille d'Eberth, son importance au point de vue de la prophylaxie de la fièvre typhoïde. 378
BUFFARD (M.).....	Voir SCHNEIDER. 715
CALMETTE(A.) et GUÉRIN(C.).	Origine intestinale de la tuberculose pulmonaire. 604
CALMETTE (A.), BOULLANGER (E.) et ROLANTS (E.).	Contribution à l'étude de l'épuration des eaux résiduaires des villes et des industries. 329
CAGNETTO (JEAN).....	Sur une variété de tuberculose zooglique et ses rapports avec la pseudo-morve. 449
CANTACUZÈNE (J.).....	Recherches sur la maladie expérimentale provoquée par l'inoculation des bacilles tuberculeux dégraissés. 699
CRUVEILHIER (L.).....	De la valeur thérapeutique de l'antitoxine dans le sérum antidiptérique. 249
DIENERT (F.).....	Des méthodes employées pour les eaux destinées à l'alimentation, et de l'interprétation à donner aux résultats obtenus. 541
DOPTER (CH.).....	Effets expérimentaux de la <sup>la</sup> toxine dysentérique sur le système nerveux. 353
— .....	Sur quelques points relatifs à l'action pathogène de l'amibe dysentérique. 417
— .....	Sensibilisatrice spécifique dans le sérum des animaux vaccinés et des malades. 753
GAUTIÉ (ALBERT).....	Sur la détermination quantitative du colibacille dans les eaux d'alimentation. 124
GAY (FREDERICK).....	La déviation de l'alexine dans l'hémolyse. 593
GIEMSA (G.).....	Coloration des Protozoaires. Remarques sur la publication de M. Marino, portant sur le même sujet. 346
GRYSEZ.....	Voir VANSTEENBERGHE. 786
GUÉRIN (C.).....	Contrôle de la valeur des vaccins jennériens par la numération des éléments virulents. 347
— .....	Voir CALMETTE. 604

	Pages.
HAALAND .....	165
LESAGE (A.) .....	9
LEVADITI (C.) .....	321
—	
LÖHLEIN .....	647
LUBOMOUDROV (P.) .....	
MARIE (A.) .....	573
MARINO (F.) .....	1
—	
MAZÉ (P.) .....	354
—	
METCHNIKOFF (E.L.) et ROUX (E.M.) .....	816
MIONI (G.) .....	378
NOC (F.) .....	481
NOURI (OSMAN) .....	673
PERRONE .....	84
REMY (L.) .....	209
—	
REMLINGER (P.) .....	266
— et OSMAN NOURI .....	367
RODELLA (A.) .....	765
—	
SUR LA DIFFÉRENCIATION DU « BACILLUS PUTRIFICUS » (BIENSTOCK) ET DES BACILLES ANAÉROBIES (ACHALME) .....	625
Les tumeurs de la souris .....	266
Culture de l'amibe de la dysenterie des pays chauds .....	404
Voir WALLICH .....	
Sur le mécanisme du phénomène de l'action fractionnée des toxines. (Phénomène de Danysz.) .....	803
Sur la phagocytose <i>in vitro</i> de microbes pathogènes .....	516
Action des injections salines prophylactiques et thérapeutiques, sur les cobayes soumis à l'inoculation intra-péritonéale de bacille typhique et de vibron cholérique .....	516
Recherches sur le sérum antirabique .....	
Au sujet de la coloration des Protozoaires. Réponse à M. Giemsa .....	516
Action des microbes vivants sur la solution de bleu azur dans l'alcool méthylique .....	516
Les microbes dans l'industrie fromagère, 1 <sup>re</sup> et 2 <sup>e</sup> parties .....	516
Les microbes dans l'industrie fromagère, 3 <sup>e</sup> partie : les fermentes de la caséine .....	516
Etudes expérimentales sur la syphilis .....	
Contribution à l'étude des hémolysines naturelles .....	516
Propriétés bactériologiques et anticytiques du venin de cobra .....	516
Voir REMLINGER .....	
Contribution à l'étude de la bactériologie de l'appendicite .....	516
Contribution à l'étude des sérum hémolytiques, recherches sur le mode d'union du sérum et des substances actives avec les globules rouges .....	516
Accidents paralytiques au cours du traitement antirabique .....	516
Réaction de la tortue terrestre à quelques maladies infectieuses .....	516
Répartition des microbes dans l'intestin du nourrisson. (Observation sur le travail de M. Tissier.) .....	516
Sur la différenciation du « Bacillus putrificus » (Bienstock) et des bacilles anaérobies (Achalme) .....	516

## TABLE DES MATIÈRES

827

	Pages.	
ROLANTS (E.).....	Voir CALMETTE.....	529
ROUX (ÉM.).....	Voir METCHNIKOFF.....	673
RUATA (GUIDO Q.).....	La formation des granulations dans les cultures des vibrions.....	661
SAUTON.....	Voir TRILLAT.....	494
SCHNEIDER (G. E.) et BUF-FARD (M.).....	Unicité de la Dourine.....	715
SERGENT (EDM. et ET.).....	Trypanosomiase des dromadaires de l'Afrique du Nord .....	47
— — — — —	Études épidémiologiques et prophylactiques du Paludisme en Algérie, en 1904.	129
SWELLENGREBEL.....	Sur la division nucléaire de la levure pressée.....	503
TCHITCHKINE (A.).....	Essai d'immunisation par la voie gastro-intestinale contre la toxine botulique..	335
THIROUX.....	Peste endémique, bubons climatiques, lymphangite infectieuse de la Réunion et érysipèle de Rio.....	62
— — — — —	Recherches expérimentales sur <i>Trypanosoma paddae</i> .....	65
— — — — —	Recherches morphologiques et expérimentales sur <i>Trypanosoma Duttoni</i> Thiroux.	564
TISSIER (H.).....	Étude d'une variété d'infection intestinale chez le nourrisson.....	273
— — — — —	Répartition des microbes dans l'intestin du nourrisson.....	409
TRILLAT (A.) et TURCHET... — et SAUTON.....	Étude sur un nouveau procédé de recherche de l'ammoniaque et des sels ammoniacaux, applicable à la caractérisation des eaux potables.....	259
— — — — —	L'ammoniaque dans le lait, recherche et interprétation de sa présence.....	494
— — — — —	Sur la présence de l'aldéhyde formique dans les produits de combustion, et sur les applications qui en découlent. Essais de désinfection.....	748
TURCHET.....	Étude historique sur l'utilisation des feux et des fumées, comme moyen de désinfection contre la peste.....	734
VALLÉE (H.).....	Voir TRILLAT.....	259
WALLICH(V.) et LEVADITI(C.).	De la genèse des lésions pulmonaires dans la tuberculose.....	649
VANSTEENBERGHE et GRYSEZ.	Sur la nature des éléments cellulaires du colostrum et du lait chez la femme....	321
	Sur l'origine intestinale de l'anthracose pulmonaire.....	786

	Pages.
VASSAL (J.-J.) . . . . .	Sur un hématozoaire endoglobulaire nouveau d'un mammifère . . . . . 224
VIALA (J.) . . . . .	Les vaccinations antirabiques à l'Institut Pasteur, en 1904 . . . . . 411
VINCENT (H.) . . . . .	Sur la signification du « Bacillus coli » dans les eaux potables . . . . . 233
WEIL (ÉMILE) . . . . .	Essais de culture du bacille lépreux . . . . . 792

---

### TABLE DES PLANCHES

---

PL. I et II.	Mémoire de M. LESAGE . . . . .	9
PL. III.	MM. ABBA et BORMANS . . . . .	49
PL. IV.	M. THIROUX . . . . .	65
PL. V, VI, VII, VIII et IX.	M. HAALAND . . . . .	165
PL. X.	M. VASSAL . . . . .	224
PL. XI.	MM. WALLICH et LEVADITI . . . . .	322
PL. XII.	M. DOPTER . . . . .	353
PL. XIII.	M. DOPTER . . . . .	417
PL. XIV.	M. CAGNETTO . . . . .	449
PL. XV.	M. SWELLENGREBEL . . . . .	503
PL. XVI.	M. THIROUX . . . . .	564
PL. XVII.	M. ÉMILE-WEIL . . . . .	792

---

*Le gérant : G. MASSON.*